

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO - UFES
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS - CCAE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS - PGCV**

TAMIRES DE ALMEIDA ANGELOS

**ISOLAMENTO, CULTURA E EFEITO DE *Viscum album* L,
DOXORRUBICINA E ASSOCIAÇÃO NA MORFOLOGIA E EXPRESSÃO
PROTEICA DE LINHAGEM CELULAR PRIMÁRIA DE
ADENOMIOEPITELIOMA MALIGNO CANINO**

ALEGRE

2025

TAMIRES DE ALMEIDA ANGELOS

**ISOLAMENTO, CULTURA E EFEITO DE *Viscum album* L.,
DOXORRUBICINA E ASSOCIAÇÃO NA MORFOLOGIA E EXPRESSÃO
PROTEICA DE LINHAGEM CELULAR PRIMÁRIA DE
ADENOMIOEPITELIOMA MALIGNO CANINO**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Pós da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Biociência Aplicada à Produção e Saúde Animal.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Oliveira Trivilin

Coorientador: Prof. Dr. Anderson Barros Archanjo

ALEGRE

2025

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

A584i

Angelos, Tamires De Almeida, 1999-
Isolamento, cultura e efeito de Viscum album L.,
doxorubicina e associação na morfologia e expressão
proteica de linhagem celular primária de
adenomioepitelioma maligno canino / Tamires De Almeida
Angelos. - 2025.
97 f. : il.

Orientador: Leonardo Oliveira Trivilin.
Coorientador: Anderson Barros Archanjo.
Dissertação (Mestrado em Ciências
Veterinárias) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências
Agrárias e Engenharias.

1. Câncer - Quimioterapia. 2. Cultura de células. 3.
Oncologia veterinária. 4. Estresse oxidativo. 5. Apoptose. I.
Trivilin, Leonardo Oliveira. II. Archanjo, Anderson Barros. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 619

TAMIRES DE ALMEIDA ANGELOS

**ISOLAMENTO, CULTURA E EFEITO DE *Viscum album* L,
DOXORRUBICINA E ASSOCIAÇÃO NA MORFOLOGIA E EXPRESSÃO
PROTEICA DE LINHAGEM CELULAR PRIMÁRIA DE
ADENOMIOEPITELIOMA MALIGNO CANINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa Biociência Aplicada à Produção e Saúde Animal.

Aprovado em 25 de Abril de 2025.

COMISSÃO EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **LEONARDO OLIVEIRA TRIVILIN**
Data: 12/07/2025 11:59:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Leonardo Oliveira Trivilin. Orientador.
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Documento assinado digitalmente
 **JANKERLE NEVES BOELONI**
Data: 15/07/2025 15:27:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Jankerle Neves Boeloni. Avaliador(a)
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Documento assinado digitalmente
 **MAYARA MOTA DE OLIVEIRA**
Data: 16/07/2025 15:37:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Mayara Mota de Oliveira. Avaliador(a)
Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (SES/RS)

À Deus,

À minha família,

E aos meus amigos,

Que independente de tudo, sempre me apoiaram,
acolheram e me guiaram.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, a Deus por toda a proteção, cuidado, força e persistência. Tenho certeza de que, se Ele não estivesse à frente, este trabalho não teria sido desenvolvido.

À minha mãe, Renilda Sgranci, e ao meu pai, José dos Angelos, que, mesmo sem entender muito, me ajudaram sendo meu porto seguro sempre que precisei.

À minha irmã, Jacylli Sgranci, por estar sempre a disposição academicamente e por sempre ser presente, cuidar e contribuir com o que consegue na minha vida.

À minha família e amigos, Raquel, Paula, Ueldiane, Marlon, Eduardo, Jaciara e Jetesson por me ajudarem, direta ou indiretamente, em algum momento da execução deste trabalho.

À Thais Tavares, por todo o ensinamento referente ao cultivo celular. Agradeço pela paciência e disponibilidade.

À Thais Togneri e à Luisa Rezende, por contribuírem sempre que solicitadas na execução da imunohistoquímica. Agradeço pela disponibilidade e boa vontade.

Ao orientador Leonardo Oliveira Trivilin, que não mede esforços para contribuir com a vida de seus orientandos, agradeço pela disponibilidade, paciência, dedicação e empenho neste trabalho.

Ao meu coorientador Anderson Archanjo, por toda a ajuda e boa vontade prestada sempre que solicitada.

Ao hospital veterinário PETSUL por contribuir com a amostra tumoral para realização da pesquisa.

À Universidade Federal do Espírito Santo, por disponibilizar o espaço e os equipamentos de qualidade que viabilizaram a produção científica deste trabalho, em especial aos laboratórios de Cultivo celular e Patologia Animal do Hospital Veterinário. Aos componentes da banca examinadora, Professoras Jankerle e Mayara por todas as contribuições e a disponibilidade em avaliar a dissertação.

À Capes, sem a qual teria sido inviável a realização desta pesquisa. Por meio dela, milhões de alunos, assim como eu, conseguem se manter e dar o seu melhor em suas atividades acadêmicas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“Coragem não é a ausência do medo, mas a
decisão de que algo é mais importante que o
medo.”*

Ambrose Redmoon, 1991.

RESUMO

ANGELOS, TAMIRES DE ALMEIDA. **Isolamento, cultura e efeito de *Viscum album* L, doxorubicina e associação na morfologia e expressão proteica de linhagem celular primária de adenomioepitelioma maligno canino**, 2025. 97p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Alegre, ES, 2025. **RESUMO:** O câncer de mama é a doença que mais acomete cadelas na medicina veterinária, carecendo de terapias precisas que afetem apenas células cancerosas, auxiliando na erradicação tumoral e sobrevida. Assim, objetivou-se isolar e cultivar uma linhagem primária de adenomioepitelioma maligno canino (AME), e avaliar os efeitos individuais e da associação de *Viscum album* L. (diluição D3) e doxorubicina na morfologia e expressão de BAX, BCL-XL, OGG, GPX e REF-1 de uma linhagem celular primária de adenomioepitelioma maligno canino. Utilizou-se uma amostra de adenomioepitelioma maligno canino proveniente de uma cadela SRD de 9 anos, para isolamento e cultivo primário das células cancerosas. Previamente, estabeleceu-se a CL50 de trabalho de *Viscum album* L. (diluição D3) em 24 e 48h (37,07 µL/mL), bem como da concentração de trabalho de doxorubicina, também após 24 e 48h de ensaio de viabilidade, definindo a concentração 1,56 µg/mL, utilizando células cancerosas em cultivo primário, 20ª passagem. As concentrações determinadas foram utilizadas para os ensaios de morfologia celular e expressão proteica por imunohistoquímica após exposição durante 24 e 48h aos tratamentos *Viscum album* L., doxorubicina e associação *Viscum album* L + doxorubicina. Os achados morfológicos demonstraram *Viscum album* L. apresentou mínimas diferenças morfológicas comparadas ao grupo controle, atuando principalmente, como agente citoprotetor enquanto doxorubicina isolada e em associação induziram fortemente à morte celular. O escore de expressão fraco positivo manteve em 24h nas proteínas BAX, BCL-XL e GPX nos grupos *Viscum album* L. e doxorubicina comparado ao grupo controle, diferindo apenas do tratamento associado *Viscum album* L. + doxorubicina. Em 48h, o escore fraco positivo se manteve presente em todos os tratamentos comparado ao grupo controle em GPX e BAX diferenciando apenas em BCL-XL os grupos *Viscum album* L. e doxorubicina comparado ao grupo controle e associação que apresentaram escore positivo. Ao comparar os tempos, obteve-se que a doxorubicina aumenta a expressão de GPX e BAX além de diminuir BCL-XL em 48 horas enquanto a associação atua aumentando a proteína pró-apoptótica. *Viscum album* L. diminuiu a marcação nuclear de OGG, enquanto doxorubicina aumentou OGG e diminuiu a marcação de REF-1. A associação dos compostos acarretou um aumento de OGG e diminuição de REF-1. Conclui-se principalmente que a associação de *Viscum album* L. e doxorubicina potencializam seus mecanismos de ação de forma tempo-resposta, além de em AME, os tratamentos isolados induzem a ativação de outros tipos de morte celular programada, além da apoptose.

Palavras-chave: cultivo primário; estresse oxidativo; fitoterápico; quimioterápico; oncologia veterinária

ABSTRACT

ANGELOS, TAMIRES DE ALMEIDA. **Isolation, culture and effect of *Viscum album* L, doxorubicin and association on the morphology and protein expression of primary cell line of canine malignant adenomyoepithelioma**, 2025. 97p. Dissertation (Master's Degree in Veterinary Sciences) - Center for Agrarian Sciences and Engineering - CCAE, Federal University of Espírito Santo - UFES, Alegre, ES, 2025. **ABSTRACT:** Breast cancer is the disease that most affects female dogs in veterinary medicine, lacking precise therapies that affect only cancer cells, helping in tumor eradication and survival. Thus, the objective of this study was to isolate and cultivate a primary canine malignant adenomyoepithelioma (AME) cell line, and to evaluate the individual effects and the association of *Viscum album* L. (D3 dilution) and doxorubicin on the morphology and expression of BAX, BCL-XL, OGG, GPX and REF-1 of a primary canine malignant adenomyoepithelioma cell line. A canine malignant adenomyoepithelioma sample from a 9-year-old SRD bitch was used for isolation and primary culture of cancer cells. Previously, the working LC50 of *Viscum album* L. (D3 dilution) was established in 24 and 48h (37.07 µL/mL), as well as the working concentration of doxorubicin, also after 24 and 48h of viability assay, defining the concentration 1.56 µg/mL, using cancer cells in primary culture, 20th pass. The concentrations determined were used for cell morphology and protein expression assays by immunohistochemistry after exposure for 24 and 48 hours to the treatments *Viscum album* L., doxorubicin and *Viscum album* L. + doxorubicin association. The morphological findings showed minimal morphological differences compared to the control group, acting mainly as a cytoprotective agent, while doxorubicin alone and in association strongly induced cell death. The weak positive expression score maintained at 24 hours in the BAX, BCL-XL and GPX proteins in the *Viscum album* L. and doxorubicin groups compared to the control group, differing only from the associated treatment *Viscum album* L. + doxorubicin. At 48 hours, the weak positive score remained present in all treatments compared to the control group in GPX and BAX, differing only in BCL-XL the *Viscum album* L. and doxorubicin groups compared to the control and association group that presented a positive score. When comparing the times, it was obtained that doxorubicin increases the expression of GPX and BAX in addition to decreasing BCL-XL in 48 hours while the association acts by increasing the pro-apoptotic protein. *Viscum album* L. decreased the nuclear labeling of OGG, while doxorubicin increased OGG and decreased the labeling of REF-1. The association of the compounds led to an increase in OGG and a decrease in REF-1. It is mainly concluded that the association of *Viscum album* L. and doxorubicin potentiate their mechanisms of action in a time-response manner, in addition to the fact that in SMA, isolated treatments induce the activation of other types of programmed cell death, in addition to apoptosis.

Keywords: primary cultivation; oxidative stress; herbal medicine; chemotherapy; veterinary oncology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etiologia e fatores de risco do desenvolvimento de neoplasias mamárias caninas.....	20
Figura 2 - Ilustração resumindo a metodologia utilizada para obtenção, estabelecimento e cultivo de uma linha primária de adenomioepitelioma canino maligno.....	43
Figura 3 - Ilustração resumindo a metodologia utilizada para determinação da CL50 de <i>Viscum album</i> L. e concentração de trabalho de doxorubicina em uma linha primária de adenomioepitelioma canino maligno.	44
Figura 4 - Ilustração resumindo a metodologia utilizada para exposição dos tratamentos <i>Viscum album</i> L., doxorubicina, associação <i>Viscum album</i> L. + doxorubicina e grupo controle em uma linha primária de adenomioepitelioma canino maligno.....	46
Figura 5 - Ilustração resumindo a metodologia utilizada para identificação de diferenças morfológicas induzidas pela exposição aos tratamentos em uma linha primária de adenomioepitelioma canino maligno.	48
Figura 6 - Ilustração resumindo a metodologia utilizada na exposição dos anticorpos GPX, OGG, REF-1, BAX e BCL-XL em células de adenomioepitelioma canino maligno expostas aos tratamentos de <i>Viscum album</i> L., doxorubicina e associação de <i>Viscum album</i> L. + doxorubicina 24/48h.	50
Figura 7 - Fotomicrografia das representações histológicas de adenomioepitelioma maligno evidenciando células tubulares (A, C e D) e alongadas (B) devido a heterogeneidade morfológica do tumor. Objetiva 20X.	52
Figura 8 - Curvas dose-resposta de <i>Viscum album</i> L. (A e B) e doxorubicina (C e D) para determinação de CL50 em 24 (A e C) e 48h (B e D) onde eixo X corresponde às concentrações de <i>Viscum album</i> L. e doxorubicina, e eixo Y corresponde aos percentuais de morte celular. CL50 obtidas a partir da regressão não linear com interpolação sigmoidal e determinação da linha de tendência.	53
Figura 9 - Fotomicrografia evidenciando algumas alterações morfológicas encontradas em células de adenomioepitelioma maligno canino expostas a <i>Viscum album</i> L, Doxorubicina e associação em 24h. A – Grupo controle; B – <i>Viscum album</i>	

L.; C - Doxorubicina; D – Associação. As setas indicam algumas das alterações celulares encontradas: seta verde, núcleo picnótico; seta preta, cariorrexe; seta amarela, escassez citoplasmática; e seta azul, célula multinucleada. Objetiva 20X. 56

Figura 10 - Fotomicrografia evidenciando as alterações morfológicas encontradas em células de adenomioepitelioma maligno canino expostas a *Viscum album* L., Doxorubicina e associação em 48h. A – *Viscum album* L.; B - Doxorubicina; C - Associação; D – Grupo controle. As setas indicam algumas das alterações celulares encontradas: seta verde, vacuolização; seta preta, cariorrexe; seta amarela, escassez citoplasmática; e seta azul, núcleos hiper cromáticos. Objetiva 20X.59

Figura 11 - Análise da expressão proteica citoplasmática de GPX em linhagem celular primária de adenomioepitelioma maligno canino, após 24h e 48h de exposição a *Viscum album* L., doxorubicina e Associação destas. Em 24h, nota-se semelhança no escore de expressão fraco positivo de GPX nos grupos controle (A), *Viscum album* L. (B) e doxorubicina (C), enquanto o grupo associação (D) influenciou significativamente no escore de expressão positivo. Em 48 horas, o grupo controle (E) permaneceu com o escore de expressão fraco positivo, seguido de modulação expressão para escore positivo nos grupos *Viscum album* L. (F) e doxorubicina (G), enquanto o grupo associação (H) predominou o escore fraco positivo diminuindo significativamente a intensidade de expressão da proteína. I) *Heatmap* da distribuição dos o escores de expressão de GPX em 24h. J) *Heatmap* da distribuição dos escores de expressão de GPX em 48h. IHQ anti-GPX. Objetiva 20X.60

Figura 12 - Análise da expressão proteica citoplasmática de BAX em linhagem celular primária de adenomioepitelioma maligno canino, após 24h e 48h de exposição a *Viscum album* L., doxorubicina e associação destas. Em 24h, nota-se semelhança no escore de expressão fraco positivo de BAX nos grupos controle (A), *Viscum album* L. (B) e doxorubicina (C), e grupo associação (D). Em 48 horas, o grupo controle (E) assim como os demais grupos, *Viscum album* L. (F), doxorubicina (G), e grupo associação (H) permaneceu o escore fraco positivo demonstrando que nesse estudo os tratamentos não alteram significativamente a intensidade de expressão dessa proteína em 24/48h. I) *Heatmap* da distribuição dos escores de expressão de BAX em 24h. J) *Heatmap* da distribuição dos escores de expressão de BAX em 48h. IHQ anti-BAX. Objetiva 20X.....61

Figura 13 - Análise da expressão proteica citoplasmática de BCL-XL em linhagem celular primária de adenomioepitelioma maligno canino, após 24h e 48h de exposição

a *Viscum album* L., Doxorrubicina e Associação destas. Em 24h, nota-se semelhança no escore de expressão fraco positivo de BCL-XL nos grupos controle (A), *Viscum album* L. (B), Doxorrubicina (C) e associação (D) não demonstrando influência significativa. Em 48 horas, permaneceu o escore fraco positivo nos grupos controle (E), *Viscum album* L. (F), doxorrubicina (G) seguido de modulação expressão para escore positivo no grupo associação (H). I) *Heatmap* da distribuição dos escores de expressão de BCL-XL em 24h. J) *Heatmap* da distribuição dos escores de expressão de BCL-XL em 24h. IHQ anti- BCL-XL Objetiva 20X.....62

Figura 14 - Percentual de ocupação da proteína GPX em linhagem celular primária de adenomioepitelioma maligno canino após 24h (A) e 48h (B) de exposição a *Viscum album* L., doxorrubicina e Associação dessas. A) Após 24h de exposição ocorreu redução significativa da proteína GPX em células tratadas com *Viscum album* L. e com doxorrubicina; ** ($p < 0,05$), *** ($p < 0,005$). B) Após 48h de exposição ocorreu aumento significativo da proteína GPX em células submetidas a todos os tratamentos preconizados; ** ($p < 0,005$). Teste ANOVA para um critério seguido do Teste de Tukey, $\alpha = 5\%$64

Figura 15 - Percentual de ocupação da proteína BAX em linhagem celular primária de adenomioepitelioma maligno canino após 24h (A) e 48h (B) de exposição a *Viscum album* L., doxorrubicina e Associação dessas. A) Houve aumento da ocupação de BAX após 24h de exposição à associação de *Viscum album* L. com doxorrubicina; * ($p < 0,05$). B) Após 48h de exposição ocorreu aumento significativo da proteína BAX em células submetidas a todos os tratamentos preconizados; * ($p < 0,05$), *** ($p < 0,0005$). Teste ANOVA para um critério seguido do Teste de Tukey, $\alpha = 5\%$65

Figura 16 - Percentual de ocupação da proteína BCL-XL em linhagem celular primária de adenomioepitelioma maligno canino após 24h (A) e 48h (B) de exposição a *Viscum album* L., doxorrubicina e Associação dessas. A) Nenhuma alteração na ocupação de BCL-XL foi observada após 24h de exposição aos quimioterápicos. B) A exposição a doxorrubicina reduz significativamente o percentual de ocupação de BCL-XL após 48h de exposição; ** ($p < 0,005$). Teste ANOVA para um critério seguido do Teste de Tukey, $\alpha = 5\%$66

Figura 17 - Imunomarcagem nuclear da proteína OGG em linhagem celular primária de adenomioepitelioma maligno canino após 24h (A) e 48h (B) de exposição a *Viscum album* L., doxorrubicina e associação dessas. A) Após 24h, a associação dos quimioterápicos aumentou significativamente a presença de OGG; ** ($p < 0,005$). B)

A exposição a *Viscum album* L. reduz significativamente a presença de OGG em relação aos demais grupos; ** ($p < 0,005$), **** ($p < 0,0001$). Teste ANOVA para um critério seguido do Teste de Tukey, $\alpha = 5\%$67

Figura 18 - Imunomarcção nuclear da proteína REF-1 em linhagem celular primária de adenomioepitelioma maligno canino após 24h (A) e 48h (B) de exposição a *Viscum album* L., doxorubicina e Associação dessas. A) Após 24h, a exposição a doxorubicina reduziu significativamente a presença de REF-1; * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,005$), *** ($p < 0,0005$). B) A exposição a doxorubicina reduz significativamente a presença de REF-1 ao controle e *Viscum album* L.; * ($p < 0,05$). Teste ANOVA para um critério seguido do Teste de Tukey, $\alpha = 5\%$68

Figura 19 - Análise comparativa da ocupação das proteínas GPX, BAX e BCL-XL em adenomioepitelioma maligno canino, entre os tempos de 24h e 48h após exposição a *Viscum album* L (A), doxorubicina (B) e associação *Viscum Album* L. + doxorubicina (C). * ($p < 0,05$). Teste t de comparação múltipla, $\alpha = 5\%$69

Figura 20 - Análise comparativa da ocupação das proteínas OGG e REF-1 em adenomioepitelioma maligno canino, entre os tempos de 24h e 48h após exposição a *Viscum album* L (A), doxorubicina (B) e associação *Viscum album* L. + doxorubicina (C). * ($p < 0,05$). Teste t de comparação múltipla, $\alpha = 5\%$70

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Classificação histológica de tumores mamários caninos segundo Cassali <i>et al</i> (2023). (<i>continua</i>)	23
Tabela 2 - Principais achados morfológicos encontrados em células de linhagem primária de adenomioepitelioma expostas a: grupos controle (sem tratamento), Viscum album L. (VA), Doxorrubicina (Doxo) e associação Viscum album L. + Doxorrubicina (VA + doxo) após exposição de 24 horas. Resultados apresentados como: ausência (0), ocorrência discreta (1-6: +), ocorrência moderada (6-12: + +) e ocorrência alta (≥ 13 : + + +).	55
Tabela 3 - Principais achados morfológicos encontrados em células de linhagem primária de adenomioepitelioma expostas a: grupos controle (sem tratamento), Viscum album L. (VA), Doxorrubicina (Doxo) e associação Viscum album L. + Doxorrubicina (VA + doxo) após exposição de 48 horas. Resultados apresentados como: ausência (0), ocorrência discreta (1-6: +), ocorrência moderada (6-12: + +) e ocorrência alta (≥ 13 : + + +).	58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 Aspectos gerais do câncer de mama canino	20
2.2 Adenomioepitelioma maligno	26
2.3 Estabelecimento de linhagens <i>in vitro</i>	28
2.4 Doxorrubicina	29
2.5 <i>Viscum album</i> L.	31
2.6 Espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo e seus papeis no câncer	34
2.7 Antioxidante GPX	35
2.8 OGG 1/2 e REF-1	36
2.9 Apoptose e seu papel no câncer	38
3. OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo geral	40
3.2 Objetivos específicos	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Coleta de amostra adenomioepitelioma maligno (AME)	41
4.2 Estabelecimento da linhagem tumoral	41
4.3 Obtenção da CL50 de <i>Viscum album</i> L. E concentração de trabalho de doxorrubicina	43
4.3.1 Ensaio de CL50 de <i>Viscum album</i> L. em 24 e 48 horas	44
4.3.2 Concentração de trabalho de doxorrubicina em 24 e 48h	44
4.4 Exposição aos fármacos e avaliação da morfologia e expressão proteica	44
4.4.1 Morfologia	46
4.5 Imunocitoquímica	47
4.6 Estatística	49
5. RESULTADOS	50
5.1 Diagnóstico histopatológico de adenomioepitelioma mamário	50
5.2 CI50 de <i>Viscum album</i> L. e doxorrubicina	51
5.3 Morfologia celular após exposição de 24 horas à doxorrubicina, <i>Viscum album</i> L. e associação doxorrubicina + <i>Viscum album</i> L.	52

5.4 Morfologia celular após exposição de 48 horas à doxorubicina, <i>Viscum album</i> L. e associação doxorubicina + <i>Viscum album</i> L.....	55
5.5 Análise do escore de expressão de GPX, BAX e BCL-XL após exposição de 24 e 48h a doxorubicina, <i>Viscum album</i> L. e associação doxorubicina + <i>Viscum album</i> L.....	58
5.6 Análise de ocupação de GPX, BAX e BCL-XL após exposição de 24 e 48 horas à doxorubicina, <i>Viscum album</i> L. e associação doxorubicina + <i>Viscum album</i> L.....	62
5.7 Análise da imunomarcção nuclear de OGG e REF-1 após exposição de 24 e 48 horas à doxorubicina, <i>Viscum album</i> L. e associação doxorubicina + <i>Viscum album</i> L.....	65
5.8 Comparação do percentual de ocupação de GPX, BAX e BCL-XL entre 24 e 48 horas após exposição à <i>Viscum album</i> L., doxorubicina e associação doxorubicina e <i>Viscum album</i> L.....	67
5.9 comparação de núcleos imunomarcados por OGG e REF-1 entre 24 e 48 horas após exposição à <i>Viscum album</i> L., doxorubicina e associação doxorubicina e <i>Viscum album</i> L.....	68
6. DISCUSSÃO.....	70
6.1 Morfologia celular após exposição de 24 e 48 horas à doxorubicina, <i>Viscum album</i> L. e associação doxorubicina + <i>Viscum album</i> L.....	70
6.2 Expressão proteica de GPX, BAX e BCL-XL.....	73
6.3 Análise de marcação nuclear de OGG e REF-1 24/ 48h e comparação entre os tempos.....	78
6.3 Comparação da resposta de GPX, BAX, BCL-XL, OGG e REF-1 nos tratamentos <i>Viscum album</i> L., doxorubicina e associação <i>Viscum album</i> L. + doxorubicina.....	80
7. CONCLUSÕES.....	84
8. REFERÊNCIAS.....	85

1. INTRODUÇÃO

O tumor mamário canino (TMC) pode acometer diferentes mamas do mesmo animal, e apresentar tipos neoplásicos distintos, sendo os neoplasmas malignos os tipos mais frequentes em cadelas, com os carcinomas liderando a lista dos diagnósticos (Gray *et al.*, 2020; Esteves *et al.*, 2022). No entanto, a origem do TMC pode ser epitelial ou mesenquimal e até mesmo uma combinação de ambas no mesmo tecido, como no caso do adenomioepitelioma (Cassali *et al.*, 2020).

O adenomioepitelioma (AME) da mama é um tumor raro, caracterizado por sua capacidade de invasão e metástase, composto por células epiteliais e mioepiteliais, apresentando prognóstico ruim e necessitando de terapias direcionadas para combater as metástases. Dessa forma, devido a agressividade e ausência de terapias direcionadas a tumores raros como o adenomioepitelioma maligno, e a necessidade de resultados positivos que acrescente na literatura científica informações para contribuir com a melhor sobrevida dos pacientes acometidos, se faz necessário o desenvolvimento de terapias menos citotóxicas às células saudáveis e mais eficientes e direcionadas as células neoplásicas (Bièche *et al.*, 2021).

A reprodutibilidade *in vitro* de células neoplásicas de forma controlada, o isolamento e cultivo celular são estratégias que facilitam os estudos com diversas substâncias, permitindo a identificação de compostos promissores, entendimento dos mecanismos de ação, padronização de testes, determinação de concentrações seguras de fármacos e fitoterápicos, identificação de efeitos citotóxicos adversos e a replicação de resultados seguros e eficientes a possíveis novos tratamentos em aplicações clínicas (Brasileiro, 2022, Jensen; Teng, 2020).

Muitos estudos utilizam células cancerosas primárias por configurarem um ótimo modelo a ser estudado. Essas células são obtidas de amostras de tecido excisadas da cirurgia, aspiradas e através de materiais de autópsia. Por serem derivadas diretamente dos organismos, estas possuem vida útil limitada quando comparada a linhagens já estabelecidas que se caracterizam pela divisão constante, sendo, portanto, um modelo de estudo restrito (Richter *et al* 2021), e suas limitações ainda incluem dificuldades no isolamento e limitação em sua replicação (Verma; Verma; Singh, 2020).

Dentre os benefícios da utilização de culturas primárias em estudos

oncológicos pode-se citar a preservação da característica tumoral, refletindo assim, a característica natural do tumor (Uysal *et al.*, 2018), a variedade transcriptômica e proteômica (Gillooly *et al.*, 2012) e preservação de marcadores celulares (Uysal *et al.*, 2018), fatos esses que favorecem estudos envolvendo terapias direcionadas.

As terapias direcionadas na oncologia veterinária utilizam, principalmente, o quimioterápico doxorrubicina que tem demonstrado grande eficácia por atuar influenciando a expressão de diversas proteínas envolvidas na apoptose, reparo de DNA e metabolismo celular, contribuindo com a sensibilidade relacionada aos tratamentos das células tumorais (Levi *et al.*, 2021; Meredith; Dass, 2016). Além disso, permite potencialização da sua ação quando combinada a outros agentes, mas, sua resposta pode ser limitada pela resistência intrínseca ou adquirida das células tumorais (Salinas-Jazmín *et al.*, 2024).

Um agente promissor estudado na oncologia atualmente, conhecido como visco-europeu ou *Viscum album* L. (VA) vem se destacando por possuir compostos naturais importantes e visado como ferramenta na oncologia integrativa. *Viscum album* L. atua, principalmente, exercendo efeito citotóxico direto sobre células tumorais, graças as lectinas e viscotoxinas presentes em seus compostos que induzem a apoptose por meio da ativação da caspase-3 e regulação de proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas, promovendo a destruição das células neoplásicas, além de inibir a angiogênese e estimular a resposta imunológica contra as células cancerosas (Klingemann, 2024; Szurpnicka; Kowalczyk; Szterk, 2020; Uçar; Arda; Aitken, 2012).

No câncer de mama humano, um estudo apontou a associação de *Viscum album* L. e doxorrubicina contribuindo com a inibição do crescimento tumoral e modulação de marcadores moleculares-chave associados à progressão do câncer das linhagens MCF-7, BT-474 e HCC-1428, além de inibir significativamente a viabilidade e proliferação celular, induzindo a apoptose de forma concentração-dependente (Park *et al.*, 2023).

Uma vez que estudos evidenciaram a ação de VA e doxorrubicina em tumores mamários, levanta-se a hipótese, nesse estudo, que a associação de *Viscum album* L. com doxorrubicina atuaria sinergicamente na regulação positiva da apoptose, e na modificação da resposta antioxidante em adenomioepitelioma maligno canino. Dessa forma, objetivou-se isolar e cultivar uma linhagem primária de células de adenomioepitelioma maligno canino, bem como avaliar os efeitos individuais e

associação de *Viscum album* L. e doxorubicina na morfologia e expressão protéica de BAX, BCL-XL, OGG, GPX e REF-1 de uma linhagem celular primária de adenomioepitelioma maligno canino.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

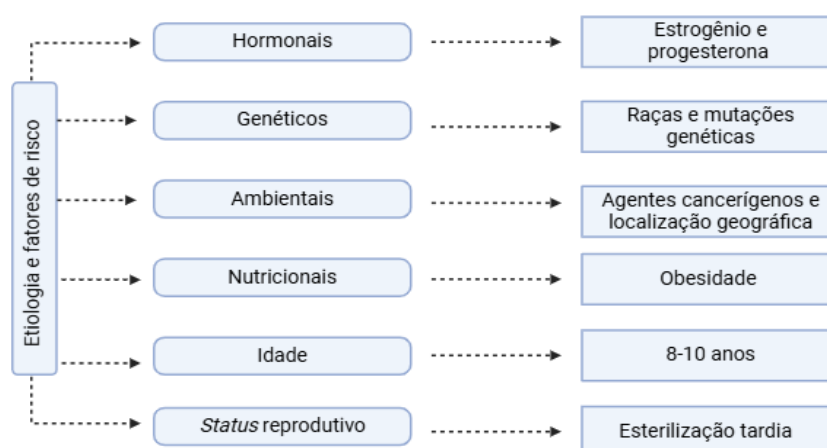
2.1 Aspectos gerais do câncer de mama canino

Os tumores mamários caninos (TMC) correspondem aos tumores que mais acometem cadelas não castradas ou com castração tardia (Benavente *et al.*, 2016; Cassali *et al.*, 2014; Rueda *et al.*, 2024). Para a classificação dos tumores como benignos ou malignos, são observados fatores macroscópicos e microscópicos. Entre os fatores macroscópicos, destacam-se o histórico do animal, exame físico, crescimento rápido, infiltração nos tecidos vizinhos e ulcerações frequentes que são indicativos de um tumor maligno. Já os fatores microscópicos envolvem principalmente a diferenciação celular: quando as células apresentam grande diferenciação, crescimento lento e não se adere aos tecidos próximos o tumor é classificado como benigno (Carvalho, 2006).

Pesquisas relacionadas a neoplasia mamária canina têm se destacado, principalmente, devido ao aumento da longevidade animal, além da espécie demonstrar semelhanças clínicas e biológicas com o câncer de mama humano (Rueda *et al.*, 2024).

A etiologia e os fatores de risco da neoplasia mamária canina são diversificados e ainda carece de estudos aprofundados, alguns fatores conhecidos são demonstrados na Figura 1.

Figura 1 - Etiologia e fatores de risco do desenvolvimento de neoplasias mamárias caninas.



Fonte: adaptado de Vazquez *et al.*, 2023.

Hormônios esteroides fazem parte do desenvolvimento das glândulas mamárias, atuando de forma positiva no crescimento fisiológico do tecido, porém, a desregulação hormonal, com perda do controle de secreção, pode desencadear o câncer e impedir a homeostase celular, favorecendo alterações indevidas pela alta produção. Dessa forma, hormônios que antes cumpriam papéis cruciais em tecidos saudáveis iniciam um processo de promoção das transformações neoplásicas, podendo contribuir para a proliferação progressiva de células defeituosas, assim como facilitando alterações genéticas (Queiroga *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2021; Vazquez *et al.*, 2023).

Os principais hormônios superexpressos em TMCs compreendem prolactina (PRL), hormônio do crescimento (GH) e principalmente estrogênios (estradiol 17 β ; E2) e progesterona (P4) (Spoerri *et al.*, 2015). A progesterona regula o hormônio do crescimento (GH) que contribui para a proliferação de células mamárias caninas, contudo, em altos níveis ele pode favorecer a sobrevida do tumor, atuando assim, como iniciadores ou promotores da doença por meio de mudanças genéticas e proliferação excessiva (Queiroga *et al.*, 2008; Torrez *et al.*, 2021; Vazquez *et al.*, 2023). Um estudo envolvendo o câncer de mama humano e canino apontou a atuação do estrogênio inibindo a apoptose e induzindo alterações genéticas que modulam a expressão de genes envolvidos na regulação da proliferação e diferenciação celular de tumores mamários como *PCNA*, *BCL-2*, *P53* e *ER*, citoqueratina (Kumaraguruparan; Prathiba; Nagini, 2006).

Alguns estudos apontaram maior prevalência tumoral em cadelas intactas (Vascellari *et al.*, 2016) que não realizaram a ovariectomia (OHE) (Santos *et al.*, 2020). Contudo, alguns cães com carcinoma mamário ER-positivos de grau 2 ou com concentração sérica de E2 pericirúrgica aumentada demonstraram se beneficiar com a realização OHE tardia (Kristiansen *et al.*, 2016).

Outro fator de risco compreende dietas ricas em gorduras que levam a obesidade, pois, evidências apontaram que animais obesos estão propensos a secreção de componentes inflamatórios como fator de necrose tumoral α , interleucina 6, leptina, adiponectina, resistina, aromatase e produções elevadas de hormônios esteroides, fato esse que favorece a ocorrência de neoplasmas mamários em cães (Vazquez *et al.*, 2023).

Outros fatores que possibilitam o desenvolvimento neoplásico são os fatores genéticos (Liu *et al.*, 2014; Arendt *et al.*, 2023). Isso pode ocorrer devido à perda de

células vitais em tecidos saudáveis ou por meio de células danificadas espontaneamente ou através de agentes carcinogênicos que não são eliminadas e que se multiplicam desordenadamente permitindo a carcinogênese (Singh; Letai; Sarosiek, 2019).

Mutações genéticas espontâneas, e agentes carcinogênicos podem induzir a doença. Agentes carcinogênicos químicos e biológicos podem promover alterações no ciclo celular, acarretando assim, proliferação excessiva, além de garantir falha no processo de morte celular (Tedardi *et al.*, 2016). Ademais, foi observado que cães de raças puras são mais acometidos comparado a cães de raças mistas, mas, a maior incidência entre raças específicas possui correlação com a localização geográfica, não havendo assim, um consenso das raças mais acometidas (Vascellari *et al.*, 2016; Vazquez *et al.*, 2023).

Devido a ampla complexidade dos tipos histológicos, os prognósticos são dificultados na doença (Li *et al.*, 2021), e a mortalidade e as morbidades em cães despertam a importância do diagnóstico precoce para que haja o tratamento apropriado (Pascoli *et al.*, 2017). O diagnóstico por meio da histologia e imunohistoquímica compreende ainda, o principal método de classificação da doença (Gray *et al.*, 2020).

Nos TMCs as células são variáveis morfollogicamente podendo constar mais de um tipo celular como células epiteliais luminais, células mioepiteliais e células mesenquimais, em combinação ou isoladamente. Sendo tumores com células mioepiteliais e mesenquimais frequentemente encontrados (Gray *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2020). Ainda, para diferir tumores malignos de benignos observa-se o pleomorfismo nuclear e celular, índice mitótico, invasão linfática, peritumoral, linfonodo metastático regional e presença de áreas necróticas, além de serem classificados quanto sua graduação histológica por meio da quantificação de anaplasia, formação de túbulos, atividade mitótica e pleomorfismo nuclear (Goldschmidt *et al.*, 2011; Vazquez *et al.*, 2023).

Ao longo dos anos, diversas classificações foram propostas, incluindo a de Goldschmidt em 2011. No entanto, revisões subsequentes levaram ao desenvolvimento de novas classificações, sendo uma das mais recente publicada por Cassali *et al.* (2023) (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação histológica de tumores mamários caninos segundo Cassali *et al* (2023). (continua)

Tipo	Descrição
Lesão epitelial não neoplásica	• Hiperplasia ductal • Hiperplasia lobular • Adenose • Ectasia ductal
Lesão de células colunares	• Alteração de células colunares • Hiperplasia de células colunares • Lesões atípicas de células colunares
Tumores benignos	• Adenoma • Adenomioepitelioma • Miopitelioma • Adenoma basaloide • Fibroadenoma • Tumor misto benigno • Papiloma ductal • Tumor filoides
Tumores malignos	
Carcinomas	• Carcinoma <i>in situ</i> • Carcinoma ductal <i>in situ</i> • Carcinoma lobular <i>in situ</i> • Carcinoma em tumor misto • Carcinoma papilar (invasivo e não invasivo) • Carcinoma tubular • Carcinoma sólido • Carcinoma basalóide • Carcinoma cribriforme
Tipos especiais de carcinoma	• Carcinoma micropapilar • Carcinoma lobular pleomórfico • Carcinoma secretor • Carcinoma mucinoso • Carcinoma rico em lipídios • Carcinoma rico em glicogênio • Carcinoma de células escamosas • Carcinoma de células fusiformes • Carcinoma com diferenciação sebácea

(conclusão)

Neoplasias mioepiteliais	• Adenomioepitelioma maligno • Mioepitelioma maligno
Sarcomas	• Fibrossarcoma • Osteossarcoma • Carcinossarcoma • Sarcoma em um tumor misto
Outros sarcomas	• Condrossarcoma • Lipossarcoma • Hemangiossarcoma • Sarcoma filoides

Fonte: Cassali *et al.*, 2023.

Em suma, fatores prognósticos clínicos e histológicos são considerados parâmetros importantes visando o comportamento e progressão do câncer (Cassali *et al.*, 2014). Os exames e diagnósticos histopatológicos são utilizados para classificar as TMCs, contudo, devido aos vários tipos histológicos de tumores e suas especificidades, além de seus diferentes comportamentos biológicos, novos marcadores relacionados a processos vitais nos tecidos como apoptose e homeostase redox contribuem nos diagnósticos mais confiáveis, assim como estimativas de prognósticos e comportamentos biológicos das TMCs (Kaszak *et al.*, 2018).

Ao se multiplicarem, as células neoplásicas criam forças devido ao ambiente propício ao seu desenvolvimento também conhecido como microambiente tumoral. Diversos fatores presentes contribuem para o crescimento progressivo das células neoplásicas, por meio de componentes como células-tronco cancerígenas (CSC), adipócitos, nervos, células estromais associadas ao tumor (fibroblastos e células endoteliais), células imunes infiltrantes (leucócitos e macrófagos) além de citocinas, fatores de crescimento e outras moléculas que permitem a iniciação, recorrência e metástase tumoral (Carvalho *et al.*, 2021; Michishita, 2020).

Alterações genéticas ou no metabolismo podem favorecer o desenvolvimento do câncer. Normalmente, esses processos são evitados graças a mecanismos moleculares que ativam a apoptose, porém, ao ocorrer desequilíbrios que afetam estruturas do DNA, a replicação, ciclo celular e hipóxia ocorre o favorecimento da

desregulação de importantes efetores pro-apoptóticos e anti-apoptóticos (Klopfleisch; Gruber, 2009).

Quando proteínas importantes de regulação são superexpressas, indica-se um comportamento tumoral mais agressivo e um pior prognóstico (Bertheau *et al.*, 2013). A expressão de proteínas como KI-67, EGFR, HER-2, ER, PR e COX-2 tem papel fundamental na patogênese, além de influenciarem na progressão e resposta terapêutica das neoplasias mamárias caninas por meio da verificação de alterações das expressões dessas proteínas (Kaszak *et al.*, 2018).

Atualmente, a excisão cirúrgica total da cadeia mamária configura o tratamento eletivo mais eficaz para controle do tumor, sendo necessário atentar-se as margens e a remoção total do tumor devido à alta capacidade de recorrência da doença e metástase quando há excisão inadequada ou incompleta (Cassali *et al.*, 2014; Medeiros, 2017).

Em diagnósticos malignos, são utilizadas a radioterapia e a quimioterapia, neste caso, a cirurgia e quimioterapia adjuvante buscam em conjunto reduzir riscos de reincidência tumoral e metástase a fim da erradicação precisa e direta de células tumorais (Nosalova *et al.*, 2024).

Algumas abordagens personalizadas possuem potencial para suprimir o crescimento tumoral, melhorar a resposta imunológica e aumentar a sobrevivência nos TMCs. Estudos previamente identificaram biomarcadores e padrões de mRNA relevantes, especialmente em cânceres caninos, que podem orientar terapias direcionadas como os inibidores de tirosina quinase, toceranib e masitinib, aprovados para o tratamento de mastocitomas em cães (Nosalova *et al.*, 2024). Avanços na análise do transcriptoma e no uso de tecnologias como *microarrays* têm mostrado correlação entre padrões moleculares e prognóstico, especialmente em linfomas e tumores mamários (Nosalova *et al.*, 2024). Ademais, a imunoterapia também se destaca, com estudos em modelos animais sugerindo eficácia de vacinas direcionadas aos antígenos HER-2 e MUC-1, frequentemente associados ao câncer de mama humano e canino (Nosalova *et al.*, 2024).

Atualmente, estudos envolvendo a quimiorresistência de linhagens de células mamárias caninas vem sendo desenvolvidos utilizando diferentes fármacos, como a doxorrubicina, que busca induzir a apoptose em células tumorais (Rivankar, 2014). Além disso, diversos protocolos são testados a fim de garantir a eficiência da funcionalidade do fármaco, como a quimioterapia metronômica que visa fazer

administrações contínuas em baixas concentrações para garantir mais eficácia (Banys-Paluchowski, *et al.*, 2016).

O aumento da casuística em clínicas humanas e veterinárias direciona uma necessidade da busca de novas terapias para controle e erradicação da doença por meio de terapias adicionais como a utilização de fitoterápicos. A OMS define os fitoterápicos como componentes derivados de ervas contendo ingredientes vegetais ou inorgânicos (OMS, 2021).

Os fitoterápicos estão cada vez mais conquistando espaço como agentes anticancerígenos (Atanasov, 2021). Dentre os resultados previamente descritos, melhoras de sintomas físicos, apoio a saúde emocional, estimulação do sistema imunológico, melhoria de qualidade de vida e alívio de efeitos colaterais do tratamento convencional foram relatados por pacientes humanos tratados com fitoterápicos (Poonthananiwatkul, *et al.*, 2015). Assim como, *Viscum album* L. já demonstrou aumentar a qualidade e sobrevida de cães com carcinoma hepatóide (Valle; Valle; Carvalho, 2024) fibrossarcoma oral (Valle; Carvalho, 2022) além de demonstrar capacidade de controlar a progressão de tumores refratários como em fibrossarcoma em esôfago (Valle; Valle, 2025).

A busca por tratamentos precisos e direcionados tem impulsionado o avanço de pesquisas voltadas para diferentes tipos de câncer. A combinação de fármacos, incluindo fitoterápicos, é amplamente investigada com o objetivo de maximizar a eliminação de células cancerosas, potencializando sua eficácia e, ao mesmo tempo, reduzindo a toxicidade para células saudáveis (Poonthananiwatkul, *et al.*, 2015).

Modelos celulares *in vitro* oferecem uma plataforma valiosa para a exploração detalhada de condições raras como o caso do adenomioepitelioma, permitindo um controle rigoroso sobre os fatores experimentais e a observação direta de processos celulares, como proliferação e diferenciação (Katt *et al.*, 2016).

2.2 Adenomioepitelioma maligno

O adenomioepitelioma maligno é um tumor mamário extremamente raro em cadelas, sendo sua ocorrência majoritariamente registrada em fêmeas, com apenas um relato descrito em um cão macho (Bièche *et al.*, 2021). Sua principal característica é a composição mista de células epiteliais e mioepiteliais, além da ausência de matriz mixoide. Estudos como os de Cassali *et al.* (2014) destacaram que a versão maligna

desse tumor apresenta sinais de alta agressividade biológica, incluindo elevado potencial metastático, diferenciando-se de sua contraparte benigna que acomete as glândulas mamárias de cadelas (Bièche *et al.*, 2021; Cassali *et al.*, 2014).

Podendo conter nódulos com glândulas proliferantes e células mioepiteliais misturadas, o AME pode ser classificado como tubular, lobular e com células fusiformes a depender do padrão de seu crescimento e as células que proliferam no tecido humano (Parul Tanwar *et al.*, 2023). Sua diferenciação com carcinomas complexos bem diferenciados pode ser difícil, porém, ao observar a ausência de cápsula, ausência de necrose e atipia, e a atividade mitótica alta dão suporte ao diagnóstico (Cassali *et al.*, 2014).

Por ser um tumor raro, relatos de casos específicos apontam outras características observadas como citoplasma amplo, vacuolizado, núcleo pequeno e hipercromático, acentuada anisocitose e anisocariose, baixo índice mitótico e discreta matriz mixoide (Silva *et al.*, 2021).

Histologicamente, este tipo de tumor apresenta dois tipos celulares sendo células cuboides a colunares, além dos túbulos que as cercam com quantidade moderada de citoplasma eosinófilo. Além disso, apresentam núcleos redondos a ovais com cromatina finamente marginada e um único nucléolo basófilo central. Ademais, quando apresentam anisocariose e a anisocitose geralmente são mínimas. Outro tipo de célula corresponde aquelas com quantidade moderada de citoplasma, sendo fusiformes a estreladas com bordas celulares mal demarcadas. Os núcleos são redondos a fusiformes com cromatina finamente pontilhada e um único nucléolo além de uma matriz mixoide fibrilar basofílica (Goldschmidt *et al.*, 2011).

No AME, ambos componentes podem propiciar a malignidade do tumor, assim como, a atividade individual dos mesmos. Como características de malignidade, pode-se observar pleomorfismo nuclear, mitose, necrose e proliferação excessiva, e estas características individuais ou em ambos os componentes possibilitam a classificação dos tumores (Parul Tanwar *et al.*, 2023).

Dessa forma, por ser um tumor maligno agressivo e extremamente raro em cães e em humanos, poucos são os estudos epidemiológicos que abordem a doença, carecendo assim, de dados extensivos quanto ao seu comportamento biológico e molecular (Zhai *et al.*, 2021). Assim, a utilização de modelos *in vitro* contribui para o entendimento da biologia da doença, assim como permite identificar compostos que busquem eliminar as células cancerosas diminuindo os danos em células saudáveis

além de permitirem o controle da maioria das variáveis experimentais e a análise quantitativa (Katt *et al.*, 2018).

2.3 Estabelecimento de linhagens *in vitro*

O estabelecimento de linhagens tumorais *in vitro* possibilita o estudo das características biológicas e moleculares das células cancerosas, sendo muito utilizado na área acadêmica por apresentar grandes benefícios que incluem baixo custo, fácil manuseio, ensaios rápidos, redução da necessidade de experimentação animal (3Rs), possibilidades de congelamento de estoques, além da homogeneidade celular e o desenvolvimento de tratamentos nas pesquisas relacionadas à triagem de drogas (Abdelmegeed; Mohammed, 2018; Li *et al.*, 2021; Caceres *et al.*, 2015).

Os experimentos *in vitro* permitem estudar vários mecanismos intracelulares em condições ambientais controláveis, como vias de sinalização celular, metabolismo, absorção e excreção de substâncias, metástase e proliferação celular. Para além, a obtenção de linhagens celulares permite analisar alterações genéticas, perfis de expressão gênica e proteica, interação tumor-microambiente como a angiogênese e inflamação, possibilitando compreender a progressão do câncer e identificar possíveis biomarcadores (Katt *et al.*, 2016).

Os estudos *in vivo* por sua vez apresentam inúmeros benefícios, porém ao ser testados em espécies diferentes apesar da similaridade, as diferenças fisiológicas entre espécies podem fazer com que substâncias seguras e eficazes em animais não tenham o mesmo efeito em humanos, além de serem mais custosos, exigir mais tempo de estudo e apresentar questões éticas. Apesar de inúmeros benefícios que conferem a oportunidade de se estudar doenças ainda existem limitações nos estudos *in vitro* principalmente devido à falta de representatividade do ambiente fisiológico real. As células em cultivo, não sofrem todas as influências que ocorrem em um organismo vivo devido à falta de interação com outros tipos celulares, metabólitos, efeitos sistêmicos e ausência do microambiente celular (Tang, 2019).

É possível estudar linhagens celulares já estabelecidas assim como linhagens primárias. A linhagem celular primária refere-se a uma cultura de células derivadas diretamente de tecidos ou órgãos de um organismo. Essas células são normalmente usadas em pesquisas laboratoriais para estudar vários aspectos da biologia celular,

fisiologia e doenças. Ao contrário das linhagens celulares imortalizados, que podem se dividir indefinidamente, as linhagens celulares primárias têm uma vida útil limitada em cultura, refletindo as restrições biológicas normais das células (Verma; Verma; Singh, 2020).

A caracterização de linhagens celulares derivadas de tumores específicos possibilita testar substâncias direcionadas para aquele tumor e permite avaliar a eficácia e segurança dos fármacos de forma individual. Além disso, a obtenção de linhagens celulares resistentes a determinados quimioterápicos por meio do cultivo celular *in vitro* contribui para o estudo dos mecanismos de quimiorresistência, pois investiga os mecanismos de citotoxicidade e resistência, por meio da exposição de células tumorais a medicamentos utilizados na quimioterapia. Dessa forma, durante o cultivo *in vitro* seleciona-se as células que sobreviveram a ação do fármaco e as avaliam comparado as suas células parentais (Mcdermott *et al.*, 2014). Fatores que contribuem para este tipo de pesquisa incluem os medicamentos direcionados, assim como, sua concentração de aplicação e o intervalo de administração (Mcdermott *et al.*, 2014).

A capacidade das células neoplásicas de driblar os efeitos dos quimioterápicos apresenta um grande problema e necessita de estudos que permitam contornar a resistência à múltiplos fármacos. Dessa forma, terapias combinadas apresentam capacidade de aumentar a eficácia e superar a resistência aos medicamentos, problema este que ocorre com muitos fármacos, fato que acarreta a limitação de seu uso e redução da sobrevida dos pacientes (Park *et al.*, 2023; Xu *et al.*, 2022).

É necessário entender os mecanismos de resistência desenvolvidos pelas células tumorais, dessa forma, a utilização de linhagens celulares de tumores mamários caninos podem ser uma ótima opção para estudos acerca de comparativos de quimiorresistência à doxorrubicina associado a fitoterápicos, pois permite compreender e desenvolver estratégias terapêuticas que restauram a sensibilidade aos fármacos antitumorais (Xu *et al.*, 2022).

2.4 Doxorrubicina

A doxorrubicina é um antibiótico pertencente às antraciclinas e derivado da bactéria *Streptomyces peucetius*. Inicialmente, um composto derivado da bactéria

denominado daunorrubicina foi introduzido na terapia contra leucemia aguda e linfoma, contudo, devido a capacidade de indução de toxicidade cardíaca fatal se fez necessário estudos envolvendo modificações genéticas que mais tarde produziu outro composto, agora com menos toxicidade conhecido como *Adriamycin* ou Doxorubicina (Arcamone *et al.*, 1969; Van Der Zanden; Qiao; Neefjes, 2020).

A doxorubicina, é um agente quimioterápico antraciclínico, amplamente utilizada no tratamento de neoplasias em cães, atuando como droga citotóxica com propriedades de amplo espectro, sendo especialmente eficaz contra tumores de alto grau de malignidade (Anjali Bisht *et al.* 2024; Rivankar, 2014) incluindo tumores mamários caninos (Levi *et al.*, 2021; Gherman *et al.*, 2023).

Sua importância se dá devido a gama de doenças onde o fármaco consegue ser utilizado, tais como, cânceres de bexiga, estômago, pulmão, tireoide, sarcoma de tecido mole, mieloma múltiplo, linfoma de Hodgkin e, principalmente, câncer de mama e ovário (Rivankar, 2014) devido sua atuação na indução da morte celular por meio da apoptose, ferroptose, necroptose e piroptose (Christidi; Brunham, 2021).

Seu mecanismo de ação complexo envolve a inibição da topoisomerase II prejudicando a replicação das células tumorais por impedir o relaxamento do DNA, a religação das cadeias no processo de transcrição induzindo a fragmentação do DNA, além de atuar na intercalação das bases nitrogenadas e, dessa forma, inibindo a replicação e transcrição do mesmo. Assim, ela atua principalmente inibindo a síntese de DNA e RNA e levando a indução da apoptose celular por meio da ativação de caspases efetoras, além de colaborar com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que promovem danos ao DNA, membranas e proteínas das células tumorais (Anjali Bisht *et al.* 2024; Gherman *et al.*, 2023).

Um dos efeitos adversos mais importantes associados ao uso do fármaco é a indução de estresse oxidativo e a diminuição de antioxidantes, podendo acarretar danos teciduais, especialmente no coração (cardiotoxicidade). O ciclo redox possibilita a doxorubicina se comportar como um receptor de elétrons pela presença da fração quinona. Quando ocorre a redução de um elétron da fração quinona através de carreadores de elétrons como NADPH e citocromo P450 redutase, DOX é convertida em um metabólito instável, o radical semiquinona. Quando nessa conformação, a semiquinona reage com o oxigênio molecular e forma o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que gera radicais hidroxila $OH^{\bullet}$ altamente reativos e tóxicos que ao encontrar composto oxidáveis, reagem causando danos a macromoléculas como lipídios, ácidos nucleicos

e proteínas (Vitale; Marzocco; Popolo, 2024).

Ainda, o fármaco consegue se acumular nas mitocôndrias das células e interfere na cadeia transportadora de elétrons, gerando alta produção de espécies reativas de oxigênio (Aryal; Rao, 2016).

Outra via de formação de EROs pela Doxo, envolve a formação do complexo Doxo-Fe³⁺, que pode ser reduzido a Doxo-Fe²⁺ e está envolvida com o aumento do estresse oxidativo pelas interações com o O₂ e a formação de moléculas reativas que geram OH· por vários sistemas redutores, como glutathione peroxidase 4 (GPX4), além disso, esse complexo é responsável pela indução da peroxidação lipídica por meio de interações com a carga negativa da membrana (Vitale; Marzocco; Popolo, 2024).

Dessa forma, o excesso de EROs produzidos pela doxorrubicina pode causar perda de integridade celular através da peroxidação lipídica, danos ao DNA pelas quebras das cadeias e oxidação de proteínas, alterando suas funções e estrutura tornando-as disfuncionais (Carvalho *et al.*, 2013; Tadokoro *et al.*, 2020).

Em cães, a utilização da doxorrubicina demonstrou eficiência na sobrevida dos animais acometidos por neoplasias mamárias malignas, além de contribuir como terapia neoadjuvante (Zambrano-estrada *et al.* 2018). No câncer de mama humano, estudos *in vitro* em linhagem celular (MCF7) demonstraram resultados positivos com a associação de Doxorrubicina com células *natural killer*-92 (NK-92) apoiando a ideia da inovação na combinação de terapias como a quimioterapia e imunoterapia (Nunghathai Sawasdee *et al.*, 2022).

2.5 *Viscum album* L.

Viscum album L. (VA) pertence à família das Viscaceae, sendo uma planta perene que cresce como semiparasita e utilizando a seiva de árvores para seu desenvolvimento (Nazaruk; Orlikowski, 2015; Szurpnicka; Kowalczyk; Szterk, 2020). Diversos estudos têm explorado seu potencial terapêutico, incluindo em tumores agressivos e obtendo resultados positivos tanto isoladamente (Figueiredo, 2012; Lucena Junior *et al.*, 2021) quanto associado a outros compostos (Wright; Watanabe; Koehler, 2022; Vaz *et al.*, 2024).

Essa planta possui diversos compostos bioativos como lectinas (I, II e III), polipeptídeos (viscotoxinas) e glicoproteínas imunoestimulatórias, flavonoides

biologicamente ativos, ácidos fenólicos, esteróis, lignanas, terpenoides e fenilpropanoides que atuam produzindo respostas citotóxicas direta sobre células tumorais, estimulando e modulando o sistema imunológico e fornecendo antioxidantes que reduzem o estresse oxidativo (Nazaruk; Orlikowski, 2015; Szurpnicka; Kowalczyk; Szterk, 2020). Esse fitoterápico possui importante papel na terapia do câncer, contribuindo para melhor qualidade de vida, além estimular o sistema imunológico, induzir a apoptose, inibir a angiogênese e atuar com atividade antitumoral por citotoxicidade direta (Elluru *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2018).

Viscum album L. atua sobre duas vias de sinalização importantes a PI3K/AKT e MAPK. A via PI3K/AKT está relacionada ao crescimento e sobrevivência de células cancerosas, dessa forma, *Viscum album L.* inibe a fosforilação de AKT induzindo a apoptose. Outra via importante é a MAPK mediada por ERK, P38 e JNK. *Viscum album L.* atua aumentando a ativação de P38 e JNK1 e reduz ERK, levando à apoptose e à parada do ciclo celular. Dessa forma, as células neoplásicas entram em apoptose e param o ciclo celular por meio da regulação negativa de ciclinas e proteínas cinases dependentes de ciclina como CCND1, CCNE, CCNA e CDK4, CDK2 (Szurpnicka; Kowalczyk; Szterk, 2020).

Ademais, *Viscum album L.* demonstrou possuir propriedades imunoadjuvantes, antioxidantes e anti-inflamatórias (Singh *et al.*, 2019). Além de atenuar enzimas antioxidantes que combatem espécies reativas de oxigênio no estresse oxidativo (Nicoletti, 2023b).

A associação de *Viscum album L.* e o quimioterápico doxorrubicina foi testado em linhagens celulares humanas MCF-7, BT-474 e HCC-1428 onde obtiveram resultados que apontam a associação em baixa dosagem aumentando os efeitos anticâncer por meio da capacidade de inibição da viabilidade e proliferação celular, supressão tumoral, indução da apoptose pela ativação de caspase 3 e possuir influência significativa no ciclo celular de células neoplásicas (Park *et al.*, 2023). Dessa forma, *Viscum album L.* atua de forma citotóxica em células neoplásicas mamárias, além de contribuir contra efeitos adversos causados por fármacos como diminuição da fadiga relacionada ao câncer, insônia, funcionamento físico e termocoerência (Oei *et al.*, 2020).

Outro achado importante revelou *Viscum album L.* com a capacidade de contornar a resistência da cisplatina em células de câncer de pulmão (Kim; Kim; Lee, 2017). Ainda, um estudo apontou a capacidade do *Viscum album L.* na modulação de

proteínas importantes que participam do câncer, como o fator de transcrição STAT3 essencial na promoção da sobrevivência, proliferação e evasão imunológica de células mamárias cancerígenas humanas, sendo um transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3) (Park *et al.*, 2023).

Essa via desempenha um papel crítico na tumorigênese e na progressão do câncer junto de seu regulador *upstream* Src. *Viscum album* L. demonstrou capacidade de regular Src e STAT3 por meio do envolvimento de SHP-1, levando à indução de morte celular programada em células de câncer de mama humano, além de aumentar os níveis de expressão de Parp clivada e caspase 3 clivada que são importantes para que ocorra apoptose (Park *et al.*, 2023).

Estudos envolvendo *Viscum album* L. demonstraram resultados antitumorais positivos no câncer de mama canino (Vaz *et al.*, 2024; Biegel *et al.*, 2022; Park *et al.*, 2023). Dessa forma, pode-se observar *Viscum album* L. modulando importantes cenários que rodeiam o câncer de mama, como a capacidade de indução positiva da expressão de proteínas importantes que regulam a apoptose como a caspase 3 clivada e PARP colaborando com a morte de células cancerígenas, além de efeitos antioxidantes que combatem reações adversas provocadas por quimioterápicos, e contribuir contra a resistência a medicamentos (Park *et al.*, 2023).

Um estudo envolvendo células tumorais do carcinoma de Ehrlich apontou que a associação do extrato alcoólico de *Viscum album* L. e doxorrubicina aumentou o efeito antiproliferativo contra células cancerígenas sem a presença de citotoxicidade (Sevastre *et al.*, 2012). Ao verificar a combinação de *Viscum album* L. e Doxorrubicina em células de câncer de mama humano ER + MCF7, observou-se a anulação da parada do ciclo G2/M e regulação negativa de P21, P53/P73 e a ativação de ERK1/2 e P38 apontando que as utilizações dos tratamentos em conjunto beneficiam a apoptose e suprime a senescência (Srdic-Rajic *et al.*, 2017).

Um estudo envolvendo várias linhagens celulares mamárias humanas como MCF-7, SKBR-3, MDA-MB-321 e PMC-42 foi realizado e apontou *Viscum album* L. injetável sendo altamente citotóxico para as linhagens mamárias estudadas, principalmente na linhagem MCF-7, além de *Viscum album* L. na diluição D3 atuar como medicamento anti-inflamatório e imunomodulador de interleucinas como IL-6 e IL-1b em células-tronco mesenquimais (Valle *et al.*, 2020).

Pesquisas em oncologia veterinária e humana sugerem que compostos naturais podem oferecer benefícios significativos em diversas doenças, dentre elas o

câncer, contudo, para que haja a inserção da prática de tratamentos incluindo fitoterápicos isolados e em combinação com fármacos alopáticos, são necessários estudos específicos e aprofundados visando entender os efeitos desses compostos, para estabelecer protocolos terapêuticos seguros e eficazes em TMC (Atanasov, 2021).

2.6 Espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo e seus papeis no câncer

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são moléculas altamente reativas e instáveis devido a um elétron desemparelhado em sua camada externa, podendo causar a redução de oxigênio de forma ineficiente, fato este que leva a formação de radicais livres hidroxila (HO^*), superóxido (O_2^*) e moléculas não radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Bedard; Krause, 2007; Jelic *et al.*, 2021).

Os EROS podem ser produzidos em diferentes organelas como mitocôndria, peroxissomos e retículo endoplasmático ou como subprodutos de reações enzimáticas ou produzidos por células atuantes do sistema imunológico, como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos através da reação da NADPH oxidase (Bedard; Krause, 2007; Jelic *et al.*, 2021).

Essas moléculas possuem grande importância na homeostase redox controlando vias importantes de regulação celular, contribuindo na eliminação de células cancerosas e no controle da proliferação, migração e diferenciação celular quando em níveis normais e em conjunto com o sistema antioxidante (Perillo *et al.*, 2020).

Ao ocorrer um desequilíbrio na produção de ROS, que excede a defesa antioxidante, as células sofrem um processo denominado estresse oxidativo, caracterizado pela perda do equilíbrio entre ROS nocivas e a ação de mecanismos antioxidantes com capacidade de neutralização celular (Greenwood; Witney, 2021).

O estresse oxidativo desempenha importante papel no processo de carcinogênese, desequilíbrios causados por ROS podem afetar vias de sinalização que atuam na proliferação celular, como a via de sinalização do receptor do fator de crescimento epidérmico, fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2, RAS/RAF, as proteínas cinases ativadas por mitógeno ERK1/2 e MEK, fosfatidilinositol 3-cinase, fosfolipase C, proteína cinase C, apoptose e até mesmo o aumento da atividade de

receptores de oncogeneses (Jelic *et al.*, 2021).

2.7 Antioxidante GPX

A principal defesa contra danos oxidantes é realizada por antioxidantes enzimáticos que neutralizam os EROs inibindo a formação e distribuição de radicais livres e colaboram na homeostase redox, ajudando a eliminar radicais livres em excesso juntamente com a defesa imunológica, beneficiando a prevenção e reparação de danos gerados pelas EROS (Jelic *et al.*, 2021).

Dentre os principais antioxidantes enzimáticos encontra-se as enzimas superóxido dismutases dependentes de íons metálicos (SODs), catalase (CAT) e glutathiona peroxidases (GPXS) que atuam catalizando superóxido e outros peróxidos diminuindo a concentração de EROs e colaborando com o equilíbrio endógeno (Abreu; Cabelli, 2010).

SOD1 e GPX atuam em conjunto protegendo a célula de possíveis danos celulares (Gurudath *et al.*, 2012). SOD1 é a principal enzima atuante em células aeróbicas e trabalha na redução do estresse oxidativo por meio da conversão de superóxido em peróxido de hidrogênio e elimina O_2 no citoplasma, sendo dessa forma, a primeira linha de frente de defesa (Schieber *et al.*, 2014). Após a conversão realizada por SOD1, o peróxido de hidrogênio consegue atuar na sinalização da proliferação celular, podendo ser convertido em água pela enzima GPX protegendo a célula do estresse oxidativo (Schieber *et al.*, 2014).

As enzimas GPXS apresentam 8 sub-membros em vertebrados tendo em sua maioria capacidade de catalisar a redução de peróxidos, utilizando glutathiona reduzida (GSH) como substrato doador de elétrons para catalizar H_2O_2 ou peróxidos orgânicos. GPX1 é encontrada no citosol eliminando espécies de peróxido hidrofílico e nas mitocôndrias protegendo o DNA mitocondrial de danos oxidativos impedindo o aumento de peróxido de hidrogênio intracelular (Jiao *et al.*, 2017).

Dentre suas funções, GPXS atuam na neutralização de EROs impedindo danos ao DNA, prevenindo mutações que podem iniciar uma transformação maligna quando superexpressas, modulam vias de sinalização celular sensíveis ao redox, que influenciam proliferação, apoptose e inflamação (Zhang *et al.*, 2021). No câncer de mama humano, observou-se a capacidade de GPX1 modificar a resposta ao estresse

oxidativo (Jablonska *et al.*, 2015).

O estresse oxidativo pode causar lesões no DNA, especialmente na base nitrogenada guanina, devido ao seu baixo potencial de oxidação. Uma lesão comum resultante é a formação de 8-oxoguanina (8-oxoG), que, se não reparada, pode levar a mutações e instabilidade genômica. Para corrigir essas lesões, as células utilizam mecanismos de reparo de DNA, como o reparo por excisão de bases que envolve enzimas específicas para reconhecer e remover bases danificadas (Berra; Frederico; Mascio, 2025).

2.8 OGG1/2 e REF-1

A via de reparo por excisão de base consiste em um mecanismo que busca realizar reparos de diversos tipos de lesões de DNA, sendo elas oxidativas, alquilação e incorporação de bases inapropriadas. Ela é regulada por enzimas que atuam de diferentes formas para manter a integridade genômica com reparos. Também conhecido como modelo de transferência, a via de reparo por excisão de base, atua no reconhecimento de lesões, clivagem de fita, eliminação de bases, recrutamento de 1 apurínica/apirimidínica (AP) (APE1), DNA pol β e DNA ligase III para a proteína de andaime X-ray *repair cross-complementing* 1 (XRCC1) para completar o processo de reparo (Krokan; Bjoras, 2013).

Ao ocorrer ataques de EROs no DNA, é formado um dos produtos mais comuns, uma lesão denominada 8-oxoguanina (8-oxoG) que configura uma forma oxidada da guanina que pode causar mutações durante a replicação do DNA. Quando não reparada, ela causa transversões G para T no DNA genômico, permitindo que o DNA exiba alta mutagenicidade e pode causar mutações de substituição durante a replicação da DNA polimerase (Yuzefovych *et al.*, 2024).

A 8-oxoguanina (8-oxoG) DNA glicosilase 1 (OGG1) reconhece a 8-oxoG e o dano por mudanças conformacionais na estrutura do DNA, e remove a 8-oxoguanina através da via de reparo por excisão de base criando um sítio abásico (AP, apurinado/apirimidínico). Logo após, a proteína OGG cliva a fita para que outros componentes de via de reparo por excisão de base como APE-1/REF1 restaurem a sequência correta buscando corrigir pequenas lesões de DNA que podem causar desaminação, oxidação ou metilação (Michaels *et al.*, 1992).

A endonuclease apurínica/apirimidínica/fator redox-1 (APE1/REF-1) reconhece os sítios AP gerados pela OGG e atua hidrolizando a ligação fosfodiéster nos sítios apurínicos/apirimidínicos (AP) gerados pela glicosilase de DNA na BER (OGG1), com isso forma-se uma extremidade 3'-OH e uma extremidade 5'-desoxirribose fosfato (5'-dRP) preparando o local para a síntese e reparação pela DNA polimerase e ligase. A DNA polimerase β (Pol β) então trabalha removendo o 5'-dRP e inserindo os nucleotídeos corretos. A DNA ligase III α em complexo com XRCC1 (reparo de raios X, complemento cruzado defeituoso, em hamster chinês, 1) sela a ligação fosfodiéster, encerrando a via BER (Izumi *et al.*, 2003; Kelley; Parsons, 2001; Summa *et al.*, 2014).

REF-1 é uma proteína que trabalha no reparo de DNA por excisão de base causados principalmente por estresse oxidativo, além de exercer controle redox de múltiplos fatores de transcrição sensíveis ao estresse oxidativo, incluindo o fator nuclear kappa B (NF- κ B), STAT3, proteína ativadora-1 (AP-1), fator induzível por hipóxia-1 (HIF-1) e proteína tumoral 53 (P53) por meio da redução de resíduos específicos de cisteínas oxidada em fatores de transcrição, restaurando sua conformação ativa, no domínio de ligação do DNA para que haja a ligação dos fatores de transcrição (Fishel *et al.*, 2014).

OGG1, atua diretamente na manutenção da integridade genômica através da prevenção de mutações que podem levar ao desenvolvimento do câncer pela reparação eficiente da 8-oxoG que evita que erros de pareamento que resultem posteriormente em mutações permanentes além de a disfunção da OGG1 poder levar ao acúmulo de lesões no DNA, aumentando o risco de mutações oncogênicas (Wang *et al.*, 2025).

Estudos apontaram que o silenciamento de REF-1 em células de câncer pancreático culminou em apoptose e diminuiu a capacidade proliferativa do tumor, além de atrasar a progressão tumoral em modelos de xenoenxerto de adenocarcinoma ductal pancreático humano. Dessa forma, por conseguir controlar inúmeros fatores de transcrição reconhecidos na tumorigênese, se faz necessário estudar essa proteína como um alvo terapêutico viável no câncer (Fishel *et al.*, 2014).

A proteína OGG demonstrou prevenir o acúmulo de mutações e regular a transcrição de vários genes de resposta ao mesmo (Wang *et al.*, 2025). Além disso, ela protege o genoma por meio de reparo de lesões ou eliminação de células com potencial maligno comprovando ser um importante antioxidante contra as EROs. Essa enzima possui a capacidade de reconhecer e eliminar bases danificadas, além de

poder adicionar bases no local da base excisada devido a atividade de lise intrínseca (Wang, *et al.*, 2018).

2.9 Apoptose e seu papel no câncer

A apoptose é um tipo de morte celular programada configurando um processo importante que regula processos fisiológicos como a homeostase tecidual permitindo que a fisiologia normal e função do tecido seja eficiente nos organismos (Voss; Strasser, 2020). Ela é caracterizada por ser um mecanismo de resposta a situações e estímulo como infecções ou danos que são incapazes de serem reparáveis (Green, 2018). Dessa forma, ao observar situações irreparáveis, a célula ativa a apoptose que por sua vez, atua como maquinaria molecular que inclui a ativação de proteases de caspase, seja por meio da via intrínseca através da permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP) ou pela ativação de receptores de morte, como Fas e DR4/5 (Green, 2018; Morana; Wood; Gregory *et al.*, 2022; Strasser *et al.*, 1995).

A família BCL-2 pode ser subdividida em proteínas anti-apoptóticas BCL-2 (BCL-2, BCL-XL, MCL-1, A1, BCL-B, BCL-W), proteínas efetoras pró-apoptóticas (BAX E BAK) e proteínas pró-apoptóticas contendo apenas um único domínio BH, domínio BH3 (BID, BIM, PUMA, NOXA, HRK, BIK, BMF, BAD). O equilíbrio entre a interação dos membros da família BCL-2 define a sobrevivência ou morte apoptótica das células, assim como, seu desequilíbrio pode contribuir com diversas doenças dentre elas, o câncer (Hanahan; Weinberg, Robert, 2011).

Muitos são os fatores que iniciam a via intrínseca mitocondrial que é regulada por proteínas da família BCL-2, sendo eles níveis limitantes de fatores de crescimento, doenças, estresse metabólico, perda de adesão do substrato, agentes citotóxicos, danos ao DNA e estresse celular (Voss; Strasser, 2020).

Ao ocorrer estímulos que desencadeiam a via mitocondrial, ocorre a permeabilização da membrana externa mitocondrial que configura uma etapa crítica que define a reversão ou não do processo de morte celular, ao ser realizada desencadeia uma cascata de reações que serão irreversíveis (Lopez, Tait; 2015; Singh; Letai; Sarosiek, 2019).

Inicialmente, são recrutadas proteínas pró-apoptóticas somente BH3, que sinalizam e transmitem sinais apoptóticos para as mitocôndrias e ativam proteínas efetoras como BAK e BAX, que contribuem na permeabilização da membrana, quando

o nível de proteínas anti-apoptóticas estão baixos, porém, em níveis normais, as proteínas anti-apoptóticas trabalham sequestrando membros pró-apoptóticos para evitar que o processo ocorra (Lopez, Tait; 2015; Singh; Letai; Sarosiek, 2019).

Ao serem ativadas, BAK e BAX se oligomerizam e formam poros na MOMP, com isso, ocorre a liberação de moléculas apoptogênicas como o citocromo C presente no citosol que em conjunto com APAF-1 forma o apoptossomo, e trabalha recrutando e ativando diversas caspases dentre elas a caspase 9 (iniciadora), 3 e 7 (executoras) respectivamente, em uma cascata de reações podendo levar a célula a morte em pouco tempo através da clivagem de diferentes substratos (Lopez, Tait; 2015; Singh; Letai; Sarosiek, 2019).

A expressão anormal de proteínas anti-apoptóticas ou diminuída de proteínas pró-apoptóticas são fatores que podem contribuir para o desenvolvimento do câncer por meio da sobrevivência de células cancerígenas e facilitando a transformação maligna (Beroukhim, *et al.*, 2010; Kaloni *et al.*, 2022; Singh; Letai; Sarosiek, 2019). Comportamentos anormais como superexpressão ou redução de membros Bcl-2 contribuem para resistência das células neoplásicas a terapêuticas anticâncer (Kaloni *et al.*, 2022).

Em estudos sobre câncer de mama canino, foi observado que a proteína BAX apresenta altos níveis de expressão em tumores metastáticos (Yildirim *et al.*, 2014; Dolka *et al.*, 2016). No caso da proteína BCL-XL, sua inibição demonstrou aumentar a eficácia da quimioterapia em carcinoma mamário humano. Ademais, sua expressão aumentada está associada à resistência à quimioterapia em casos de câncer de mama triplo-negativo humano (Noquect *et al.*, 2024).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Isolar e cultivar uma linhagem primária de adenomioepitelioma maligno canino, e avaliar os efeitos individuais e associação de *Viscum album* L. e doxorrubicina na morfologia e expressão proteica de BAX, BCL-XL, OGG, GPX e REF-1 de uma linhagem celular primária de adenomioepitelioma maligno canino

3.2 Objetivos específicos

- Obter linhagem celular primária de adenomioepitelioma maligno canino.
- Determinar a CL50 de *Viscum album* L. em 24 e 48h, assim como a CL50 média.
- Determinar a concentração de trabalho de doxorrubicina que mantenha células viáveis para o estudo de morfologia e expressão proteica por imunohistoquímica.
- Avaliar as alterações morfológicas em linhagem primária de adenomioepitelioma maligno canino após 24 e 48h de exposição à CL50 média de *Viscum album* L. e concentração de trabalho de doxorrubicina, assim como a associação dos dois fármacos.
- Avaliar a expressão e ocupação de marcadores moleculares relacionados ao reparo antioxidante como GPX, OGG, REF-1 e apoptose de via intrínseca como BAX e BCL-XL por meio da imunocitoquímica, de acordo com a exposição de 24 e 48h a *Viscum album* L., doxorrubicina e associação.
- Investigar os efeitos de doxorrubicina e *Viscum album* L. isoladamente e em associação com doxorrubicina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de amostra adenomioepitelioma maligno (AME)

Amostra de tecido neoplásico medindo aproximadamente 11 cm³ foi obtida de um acadela no Hospital Veterinário “PET SUL”, Cachoeiro de Itapemirim, Brasil e adicionada imediatamente em solução PBS+antibiótico para ser levada à Sala de Cultivo Celular do Laboratório Multiusuário de Experimentação (LABMEX) da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus de Alegre, para coleta de fragmento utilizado para a extração celular e estabelecimento da cultura. A amostra tecidual restante foi encaminhada para o Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre, para processamento histopatológico e diagnóstico.

A raça da cadela doadora é SRD, vive em ambiente urbano e possuía 9 anos na época da coleta da amostra. A lesão da glândula mamária foi removida cirurgicamente para fins diagnósticos e terapêuticos e amostra de tecido foi fornecida para o presente estudo com a permissão da tutora da cadela, com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Após processamento histopatológico de rotina e coloração com hematoxilina e eosina, a amostra tumoral foi avaliada por patologista veterinária e classificada como adenomioepitelioma maligno de acordo com os critérios histopatológicos.

Os procedimentos experimentais incluídos nesse estudo foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, Campus Alegre (CEUA-ALEGRE) por meio do protocolo 016/2024.

4.2 Estabelecimento da linhagem tumoral

O estabelecimento da linhagem tumoral foi baseado em metodologias previamente estabelecidas conforme Caceres *et al* (2015). A figura 2 ilustra e resume os procedimentos utilizados (descrito abaixo) para o estabelecimento da linhagem primária de adenomioepitelioma maligno canino.

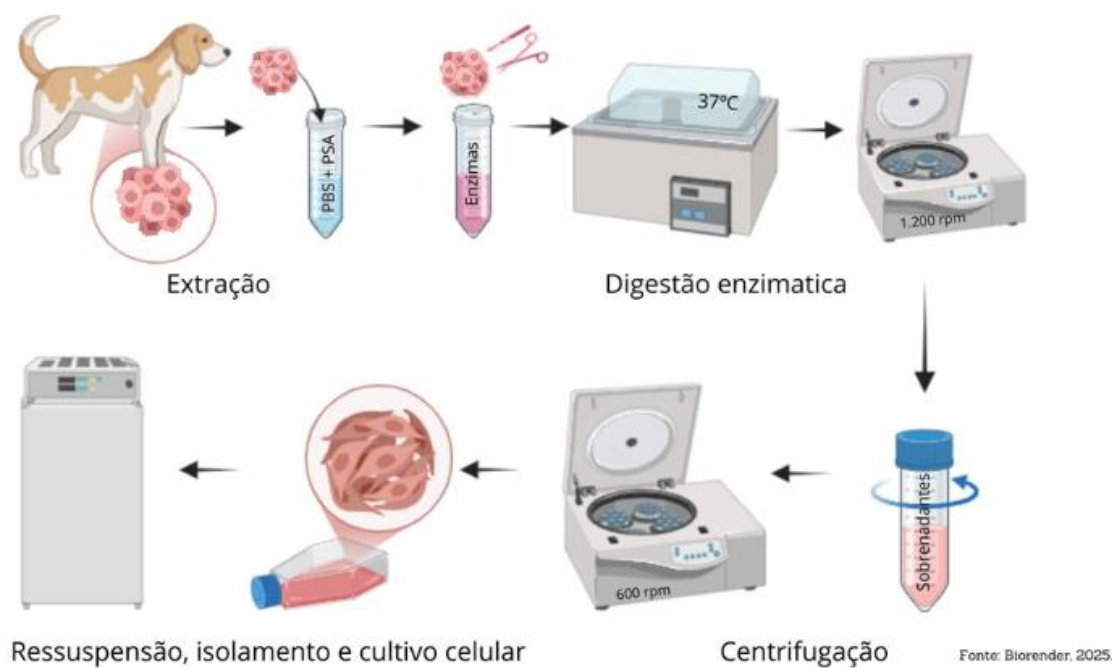
No fluxo laminar, a amostra de AME foi lavada três vezes com solução salina

PBS+antibiótico durante 5 minutos. Após descartar a solução PBS-antibiótico, o fragmento tumoral foi adicionado em solução tampão PBS+ EDTA+ Tripsina 0,25% + collagenase I para iniciar a digestão tecidual. Para contribuir com o processo, a amostra foi fragmentada com auxílio de pinças e tesouras estéreis em fragmentos menores para serem levados ao banho-maria em temperatura 37°C por 20 minutos submetido a agitação manual constante. Em seguida, os fragmentos foram submetidos a centrifugação em 1.800 rpm por 5 minutos sendo retirado o sobrenadante e armazenado com DMEM+SFB 10% + 1% Antibiótico-antimicótico. Os sobrenadantes armazenados foram submetidos à centrifugação a 600 rpm durante 5 minutos seguido de armazenamento em tubo falcon 50 mL estéril na estufa CO₂.

Após finalizar a digestão e separação das células neoplásicas os tubos contendo os sobrenadantes coletados foram levados para centrifugação a 1.100 rpm por 5 minutos. Logo após, os sobrenadantes foram descartados e acrescentado solução DMEM suplementada com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de antibiótico-antimicótico para ressuspensão das células seguida da distribuição em garrafas de cultivo celular T75 onde foram mantidas em estufa de cultivo atmosfera umidificada em 5% de dióxido de carbono (CO₂) a 37°C.

Uma vez que a confluência de densidade atingiu 90%, as células foram lavadas três vezes com PBS e acrescentada tripsina 0,25%. A tripsinização era encerrada usando DMEM contendo 10% de SFB. A linhagem celular foi mantida sob condições de subcultura contínua por 20 passagens a fim da estabilização da linhagem (Figura 2).

Figura 2 - Ilustração resumindo a metodologia utilizada para obtenção, estabelecimento e cultivo de uma linha primária de adenomioepitelioma canino maligno.



Fonte: autoral, 2025.

4.3 Obtenção da CL50 de *Viscum album* L. e concentração de trabalho de doxorubicina

Para verificar a CL50 de *Viscum album* L. e a concentração de trabalho de doxorubicina em 24 e 48h, utilizou-se o ensaio de viabilidade celular pelo MTT (*MTT Cell Viability Assay*) que consiste em um ensaio colorimétrico utilizado tanto para avaliar a viabilidade celular quanto para proliferação celular. O método baseia-se na capacidade das células metabolicamente ativas de reduzir o corante MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) em um precipitado roxo de formazan. Em suma, o corante MTT é adicionado ao meio de cultura celular em células metabolicamente ativas, em sequência a enzima mitocondrial redutase converte o MTT em cristais de formazan. Após um tempo de incubação, um solvente dissolve os cristais formados e a intensidade da cor roxa gerada é medida em um espectrofotômetro onde quanto maior a absorbância, maior o número de células viáveis.

Neste trabalho, para ambos os fármacos, 10.000 células/poço foram semeadas em triplicata em placas de cultura de células de 96 poços e incubadas durante 24h para adesão celular. O procedimento resumido pode ser visualizado na Figura 3.

Figura 3 - Ilustração resumindo a metodologia utilizada para determinação da CL50 de *Viscum album* L. e concentração de trabalho de doxorubicina em uma linha primária de adenomioepitelioma canino maligno.



Fonte: Biorender, 2025.

Fonte: Autoral, 2025

4.3.1 Ensaio de CL50 de *Viscum album* L. em 24 e 48 horas.

O *Viscum album* L. utilizado foi obtido comercialmente da Empresa INJECTCENTER Laboratório de Produtos Farmacêuticos, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. O fitoterápico na dinamização (potência) D3 estava acondicionado em ampolas contendo 1,1 mL.

Para a determinação da CL50 de *Viscum album* L. em 24 e 48 horas, utilizou-se as concentrações: controle (ausência *Viscum album* L.), 14,7 µL/mL, 17,8 µL/mL, 26,1 µL/mL, 38,3 µL/mL, 56,2 µL/mL, 82,5 µL/mL e 100 µL/mL e incubadas por 24 h e 48h conforme estudos pré-estabelecidos por Valle *et al.* (2020).

Passado o período de exposição, foram adicionados (5mg/ml) de MTT e incubado por 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Ao observar os cristais de

formazano, foi adicionado solução SDS-10% de HCL e procedeu-se a análise em leitor de microplacas em 595nm de comprimento de onda, para obtenção da absorbância. A partir dos resultados, calculou-se a viabilidade celular, considerando o controle (ausência de *Viscum album* L.) com viabilidade de 100% e as demais concentrações com viabilidade relativa ao grupo controle. Assim, obteve-se o percentual de mortalidade celular em cada concentração, que foi utilizado para o cálculo da CL50 por meio da determinação da equação de regressão não linear, onde a mortalidade celular foi a variável dependente e as concentrações a variável independente, com interpolação sigmoidal.

Determinou-se a CL50 de *Viscum album* L. de 24h e 48h, para a determinação da CL50 média como limite para utilização nos experimentos posteriores, uma vez que o limite mínimo definido para a condução dos demais experimentos foi de 70% de viabilidade.

4.3.2 Concentração de trabalho de doxorrubicina em 24 e 48h

Para esse ensaio, o quimioterápico doxorrubicina liofilizado (50 mg), foi reconstituído acrescentando 48 mL de água para injeção, obtendo-se a concentração 1,04mg/mL. Após o período de adesão celular, as células tumorais foram expostas à diferentes concentrações de doxorrubicina em meio de cultivo: controle (ausência de doxorrubicina), (10,4 µg/mL), (15,6 µg/mL), (31,2 µg/mL), (72,8 µg/mL), (104,0 µg/mL) e (156,0 µg/mL).

Procedeu-se a determinação da CL50 de doxorrubicina, conforme descrito anteriormente no item 4.3.1. No entanto, após averiguação de intensa morte celular nos ensaios para a determinação de CL50 de doxorrubicina, novos ensaios foram conduzidos, utilizando as concentrações 1 µg/mL, 1,5 µg/mL, 2 µg/mL e 3 µg/mL, para a definição da concentração de trabalho para os ensaios posteriores de morfologia e expressão proteica, preconizando viabilidade celular adequada (limite mínimo de 70% de viabilidade).

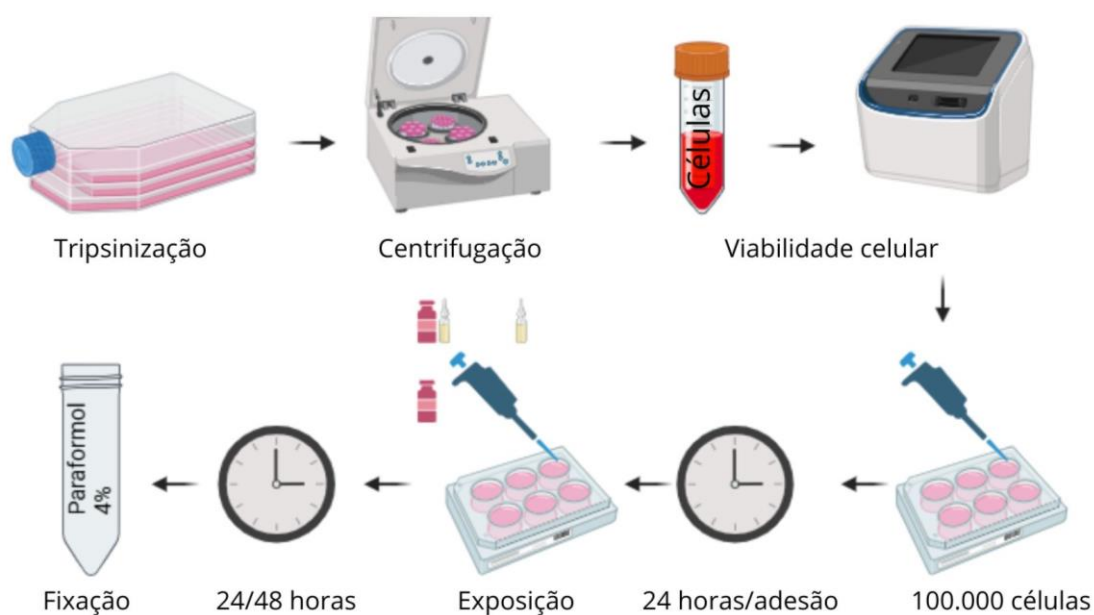
4.4 Exposição aos fármacos e avaliação da morfologia e expressão proteica

Para essa etapa do experimento (Figura 4), foram feitas tripsinizações conforme descrito anteriormente, e as células foram recolhidas da garrafa e em

seguida submetidas a centrifugação de 1.200 rpm por 8 minutos e descarte do sobrenadante. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 2 mL de meio DEMEM para a determinação da viabilidade e contagem de células vivas utilizando azul de tripan 0,4% e contador Countess automatizado de células. Foram adicionadas 100.000 células em cada placa de seis poços conforme determinação do fabricante contendo lamínulas 24x24 mm para o ensaio de imunocitoquímica e morfologia para aderência das células.

Após 24 horas de aderência, o meio de cultivo foi retirado e foram adicionadas as concentrações estabelecidas de cada fármaco juntamente com novo meio, sendo 1,56 µg/mL de Doxorrubicina e 33,7 µg/mL de *Viscum album* L. nos respectivos poços, além da associação com ambas as concentrações e DMEM conforme determinação do fabricante resultando em um volume final de 3 mL em cada poço. Após 24 e 48 horas de exposição, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos, e seguiram para imunomarcagem de proteínas por imunocitoquímica e análise morfológica conforme metodologia detalhada a seguir.

Figura 4 - Ilustração resumindo a metodologia utilizada para exposição dos tratamentos *Viscum album* L., doxorrubicina, associação *Viscum album* L. + doxorrubicina e grupo controle em uma linha primária de adenomioepitelioma canino maligno.



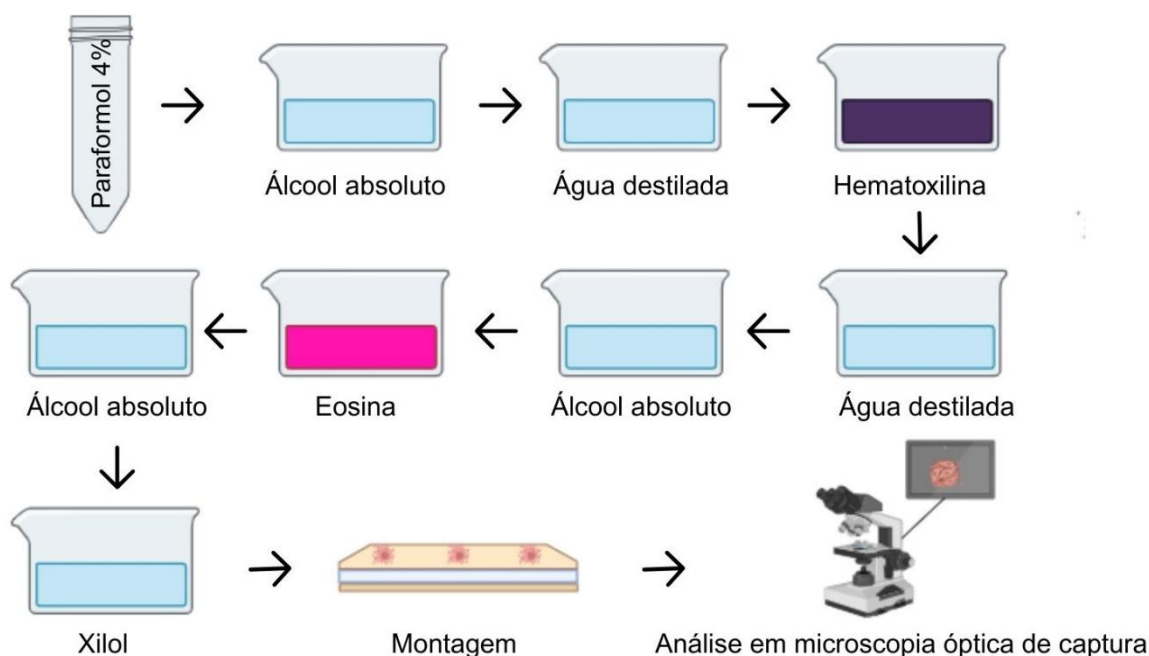
4.4.1 Morfologia

Após procedimento descrito anteriormente (item 4.4), e fixação em solução com paraformolaldeído 4% para fixação durante 15 minutos, as células foram submetidas ao protocolo de coloração com hematoxilina e eosina. Inicialmente, foram realizados dois procedimentos de hidratação com álcool absoluto por cinco minutos cada, seguidos de lavagem com água comum e água destilada respectivamente. Para a coloração, adicionou-se às células, hematoxilina de Harris durante três minutos seguida de imersão em água por 10 minutos. Em seguida, as lamínulas foram submetidas a álcool absoluto rapidamente e adicionados eosina por cinco minutos. Finalizando o procedimento, ocorreram dois banhos para desidratação com álcool absoluto por três minutos cada e fixação em xilol para montagem com *Permount* (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA).

As lâminas foram avaliadas em microscopia óptica de captura em aumento de 20x, onde foram obtidas cinco fotomicrografias em campos aleatórios para descrição morfológica das células em todos os tratamentos (Figura 5).

Sequencialmente, foram analisadas as cinco fotomicrografias dos tratamentos *Viscum album* L, doxorrubicina e associação *Viscum album* L. + doxorrubicina no software Image J a partir de quatro quadrantes de 2000 μm^2 cada, onde as alterações morfológicas de cada quadrante foram somadas e correspondiam a uma fotomicrografia. Após a análise, as alterações citoplasmáticas e nucleares que indicaram transição para morte celular das cinco fotomicrografias foram somadas e avaliadas segundo a ocorrência de aparição onde correspondiam a ausência (0), ocorrência discreta (1-6: +), ocorrência moderada (6-12: ++) e ocorrência alta (≥ 13 : +++) representadas pelos respectivos símbolos.

Figura 5 - Ilustração resumindo a metodologia utilizada para identificação de diferenças morfológicas induzidas pela exposição aos tratamentos em uma linha primária de adenomioepitelioma canino maligno.



Fonte: Autoral, 2025.

4.5 Imunocitoquímica

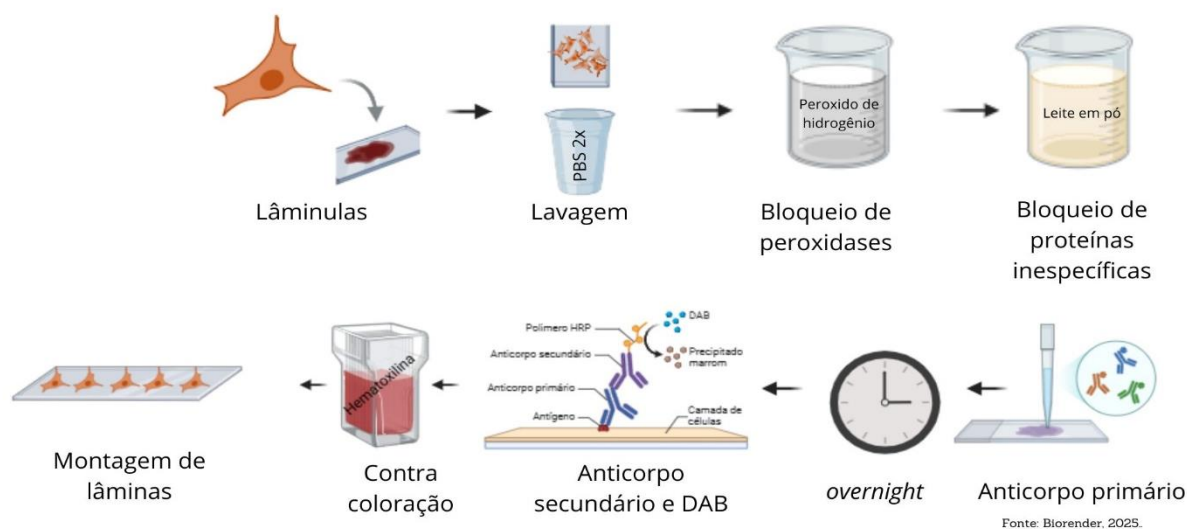
Iniciando a imunocitoquímica, as células passaram por três banhos em solução PBS 1,5X para prosseguir ao bloqueio das peroxidases endógenas com peróxido de hidrogênio a 30% em álcool metílico, na proporção 3:1 durante 30 minutos em temperatura ambiente. As lamínulas seguiram encubadas em PBS 1,5X + 0,1% TRITON por 15 minutos. Em seguida, durante 1 hora ocorreu o bloqueio de proteínas inespecíficas (10 gramas de leite em pó diluído em 200 ml de PBS 1X) durante 60 minutos em temperatura ambiente e posteriormente foram feitas as lavagens em PBS 1,5X quatro vezes por 5 minutos. Posteriormente, uma solução de anticorpos foram incluídos sobre as lamínulas experimentais sendo BAX, BCL-XL, OGG1/2, REF-1, e GPX com diluição padronizada a 1:100 permanecendo em *overnight*.

Depois de três banhos de 5 minutos em PBS 1,5X, as lamínulas foram incubadas com o sistema de detecção (N- Histofine– Simple Stain Rat Max PO, 414191F, NICHIREI®) a 25 °C durante 30 minutos. Após três lavagens com PBS 1,5X, a coloração foi visualizada com 3,3-diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO)

com diluição a 1:50, por 5 minutos. As lamínulas passaram por quatro banhos de 2 minutos com água destilada. Todas as lamínulas foram contrastadas com hematoxilina de Harris durante 3 minutos, desidratadas em álcool etílico, limpas em xilol e montadas com *Permount* (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) (Figura 6).

As lâminas foram analisadas por microscopia óptica em aumento objetiva de 20x onde realizou-se cinco fotomicrografias de campos aleatórios, de cada amostra, que posteriormente foram analisadas no software Image J utilizando o *plugin IHC Profiler* que realiza uma análise pixel a pixel de uma imagem IHC digital e ainda atribui uma pontuação em um sistema de quatro camadas (P: 0,0001, CI = 95%). Dessa forma, foram atribuídos escores qualitativos de marcação (negativo, fraco positivo e positivo) com base na intensidade da coloração observada, refletindo a quantidade relativa de proteína presente nas amostras. Além disso, foi realizada a análise da ocupação de marcação das proteínas GPX, BAX e BCL-XL, a qual corresponde à porcentagem da área citoplasmática total que apresentou coloração positiva, permitindo estimar a extensão da expressão proteica, independentemente da intensidade da marcação. Também foi efetuada a contagem dos núcleos marcados para as proteínas OGG e REF-1 nas células pertencentes aos grupos tratados com *Viscum album* L., doxorubicina e associação, utilizando-se fotomicrografias obtidas com aumento de 20x.

Figura 6 - Ilustração resumindo a metodologia utilizada na exposição dos anticorpos GPX, OGG, REF-1, BAX e BCL-XL em células de adenomioepitelioma canino maligno expostas aos tratamentos de *Viscum album* L., doxorubicina e associação de *Viscum album* L. + doxorubicina 24/48h.



Fonte: Autoral, 2025.

4.6 Estatística

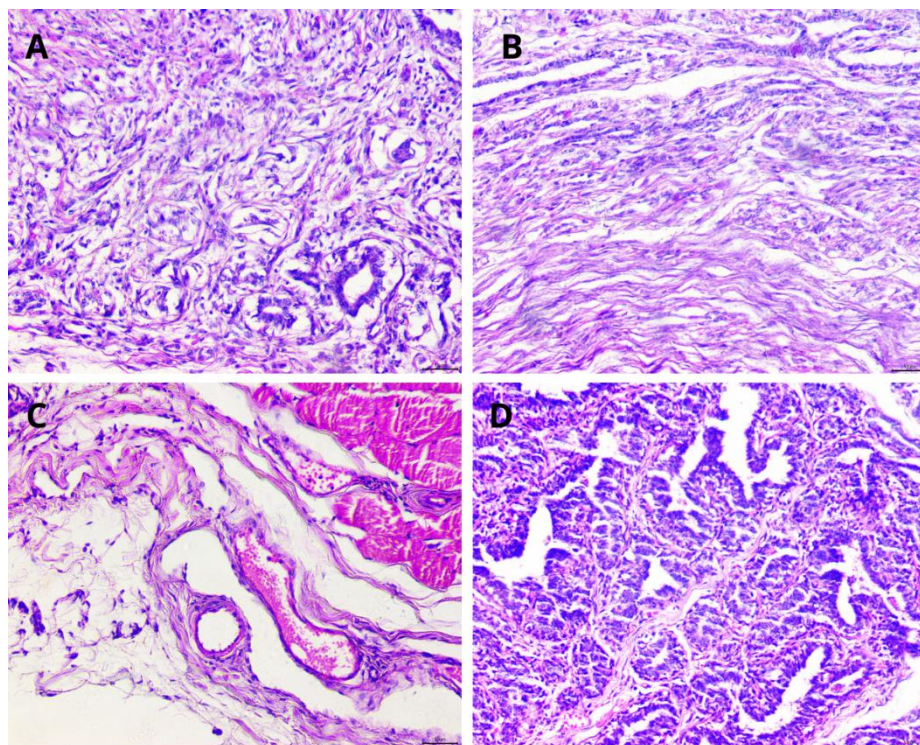
Os dados obtidos para o escore de expressão e percentual de ocupação das proteínas foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade da distribuição. Assim, para avaliar a influência de doxorubicina, *Viscum album* L. e a associação dessas nos escores de expressão das proteínas GPX, BAX, BCL-XL utilizou-se o teste Exato de Fisher, seguido pela análise de partição e dos resíduos. Os percentuais de ocupação das proteínas GPX, BAX e BCL-XL, assim como o número de núcleos imunocorados por OGG e REF-1 foram analisados por meio do teste ANOVA para um critério, seguido pelo teste de Tukey para comparação das médias. A comparação dos resultados entre 24 e 48h foi realizada utilizando o teste t não pareado. A determinação da CL50 ocorreu por meio do teste de Regressão não linear e interpolação gráfica sigmoidal. Os resultados estatisticamente significativos foram indicados por $p < 0,05$. As análises estatísticas e produção dos gráficos foram desenvolvidas no programa GraphPad Prism versão 10.4.1 DEMO.

5. RESULTADOS

5.1 Diagnóstico histopatológico de adenomioepitelioma mamário

Durante a análise macroscópica da amostra tecidual verificou-se um fragmento de pele pilosa contendo mama (M4) medindo 5,0x3,5x3,0 cm, firme, brancacento e apresentando nódulo elevado medindo 2,5x1,5 cm, firme, acinzentado e, ao corte, apresentou-se brancacento com áreas multifocais enegrecidas e continha área enegrecida focal de 1,0x0,9 cm. Os achados microscópicos revelaram proliferação neoplásica não encapsulada, infiltrativa, constituída por células ovais a poliédricas, formando túbulos, anisocitose moderada e algumas células com limites citoplasmáticos pouco precisos, citoplasma discreto, muitas vezes eosinofílico, núcleos redondos a ovais, cromatina frouxa, nucléolo evidente, cerca de 10 mitoses em 10 campos de maior aumento (40x, 2,37 mm²) e anisocariose moderada. Observou-se, ainda, proliferação celular constituída por células alongadas, limites citoplasmáticos imprecisos, núcleos ovais e alongados, cromatina frouxa, nucléolo evidente, anisocariose moderada e cerca de 8 mitoses em 10 campos de maior aumento (40x, 2,37 mm²). Houve ainda, área focal de diferenciação cartilaginosa (Figura 7).

Figura 7 - Fotomicrografia das representações histológicas de adenomioepitelioma maligno evidenciando células tubulares (A, C e D) e alongadas (B) devido a heterogeneidade morfológica do tumor. Objetiva 20X.



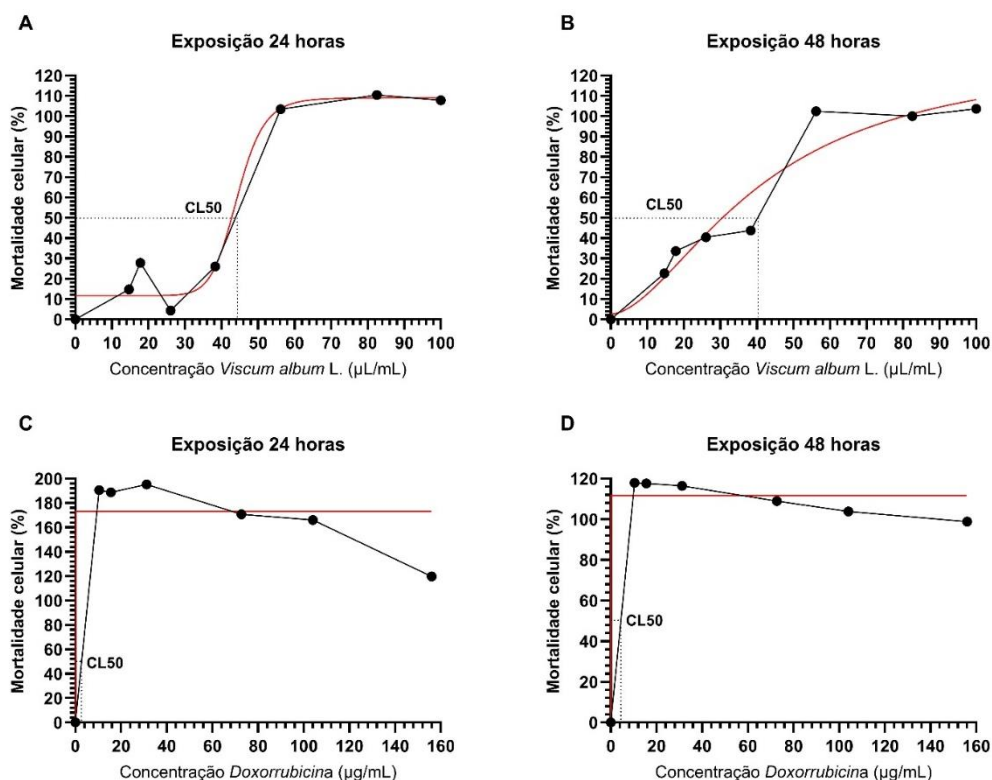
Fonte: Próprio autor, 2025.

5.2 CL50 de *Viscum album* L. e doxorubicina

As concentrações de *Viscum album* L. utilizadas para a determinação da CL50 mostraram que após 24h de exposição a *Viscum album* L., a CL50 foi de 44,36 $\mu\text{L/mL}$ (R^2 0,9721) (Figura 8A), enquanto a exposição de 48h perfaz uma CL50 de 41,68 $\mu\text{L/mL}$ (R^2 0,9309) (Figura 8B). Assim, obteve-se a CL50 média de 43,02 $\mu\text{L/mL}$. Entretanto, como preconizou-se a viabilidade celular mínima de 70% para a condução dos demais experimentos nesse estudo, a concentração de *Viscum album* L. utilizada para o estudo da morfologia celular e expressão proteica foi 33,7 $\mu\text{L/mL}$.

Conforme mencionado anteriormente, as concentrações de doxorubicina preconizadas para o ensaio de CL50 resultaram em acentuada redução da viabilidade celular (Figura 8C E 8D), necessitando de novos ensaios que resultou na concentração 1,56 $\mu\text{g/mL}$, pois, promoveu morte celular em torno de 25% (24h) e 30% (48h), sendo definida como concentração de trabalho para os demais experimentos.

Figura 8 - Curvas dose-resposta de *Viscum album* L. (A e B) e doxorrubicina (C e D) para determinação de CL50 em 24 (A e C) e 48h (B e D) onde eixo X corresponde às concentrações de *Viscum album* L. e doxorrubicina, e eixo Y corresponde aos percentuais de morte celular. CL50 obtidas a partir da regressão não linear com interpolação sigmoidal e determinação da linha de tendência.



Fonte: Próprio autor.

5.3 Morfologia celular após exposição de 24 horas à doxorrubicina, *Viscum album* L. e associação doxorrubicina + *Viscum album* L.

O grupo controle apresentou morfologia variada, com células predominantemente fusiformes e poligonais, contendo citoplasma basofílico, pouco compactado e com prolongamentos citoplasmáticos finos. Os núcleos demonstraram-se ovais a arredondados, com frequência maior de eucromatina comparado a heterocromatina. Alterações nucleares foram observadas como: discreta presença de picnose e cariorrexe, hiperchromasia moderada e discreta presença de vacuolização. Ainda, foram observadas discretas figuras mitóticas, lise celular e células multinucleadas conforme apresenta a tabela 2 (Figura 9A).

Células expostas à CL50 média de *Viscum album* L. apresentaram variação morfológica, com predominância de formas fusiformes e poligonais, contendo moderado citoplasma compactado e levemente basofílico, exibindo prolongamentos citoplasmáticos. Os núcleos demonstraram alta presença de morfologia oval, arredondados e hipercromáticos, com frequência maior de eucromatina comparado a heterocromatina. Alterações nucleares foram observadas como: moderada presença de picnose e cariorrexe, além de moderada presença de vacuolização. Ainda, foram observadas discretas figuras mitóticas, lise celular e células multinucleadas conforme apresenta a tabela 2 (Figura 9B).

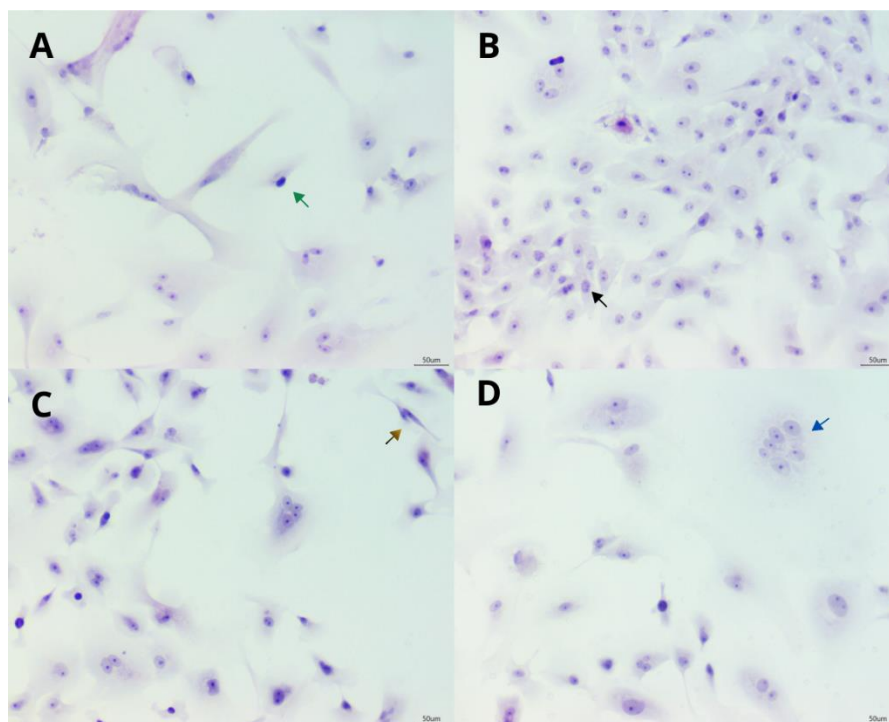
Células expostas à doxorrubicina apresentaram variação morfológica com predominância de formas arredondadas, fusiformes e poligonais, contendo moderado citoplasma compactado e basofílico, exibindo prolongamentos citoplasmáticos. Os núcleos demonstraram alta presença de morfologia ovais e moderadamente alongados, com alta presença de núcleos hipercromáticos, com frequência maior de eucromatina comparado a heterocromatina. Alterações nucleares foram observadas como: alta presença de picnose e cariorrexe, além de moderada presença de vacuolização. Ainda, foram observadas moderadas figuras mitóticas, discreta lise celular e alta presença de células multinucleadas conforme apresenta a tabela 2 (Figura 9C).

Células expostas à associação de doxorrubicina e *V. album* L. apresentaram morfologia variada, com predominância de formas fusiformes e poligonais, contendo alta presença de citoplasma compactado, ou seja, escasso e basofílico, exibindo prolongamentos citoplasmáticos. Os núcleos demonstraram alta presença de morfologia ovais e moderadamente alongados, com alta presença de núcleos hipercromáticos, com frequência maior de eucromatina comparado a heterocromatina. Alterações nucleares foram observadas como: alta presença de picnose e cariorrexe, além de alta presença de vacuolização. Ainda, foram observadas discretas figuras mitóticas, moderada lise celular e presença de células multinucleadas conforme apresenta a tabela 2 (Figura 9D).

Tabela 2 - Principais achados morfológicos encontrados em células de linhagem primária de adenomioepitelioma expostas a: grupos controle (sem tratamento), *Viscum album* L. (VA), Doxorrubicina (Doxo) e associação *Viscum album* L. + Doxorrubicina (VA + doxo) após exposição de 24 horas. Resultados apresentados como: ausência (0), ocorrência discreta (1-6: +), ocorrência moderada (6-12: ++) e ocorrência alta (≥ 13 : +++).

	Controle	VA	Doxo	VA + doxo
Morfologia				
Arredondadas	0	0	+++	0
Fusiformes	++	++	++	++
Poligonais	+++	+++	+++	+++
Escassez				
Citoplasmática	+	++	++	+++
Vacuolização	+	++	++	+++
Forma nuclear				
Ovais	+++	+++	+++	+++
Alongados	+++	+++	++	++
Cromatina				
Heterocromatina	++	++	+++	++
Eucromatina	+++	+++	+++	++
Núcleos				
hipercromáticos	++	+++	+++	+++
Nucléolos	+++	+++	+++	+++
Alterações nucleares				
Cariorrexe	+	++	+++	+++
Picnose	+	++	++	+++
Lise celular	+	++	+	++
Figuras mitóticas	+	+	++	+
Células				
multinucleadas	+	+++	+++	++

Figura 9 - Fotomicrografia evidenciando algumas alterações morfológicas encontradas em células de adenomioepitelioma maligno canino expostas a *Viscum album* L, Doxorubicina e associação em 24h. A – Grupo controle; B – *Viscum album* L.; C - Doxorubicina; D – Associação. As setas indicam algumas das alterações celulares encontradas: seta verde, núcleo picnótico; seta preta, cariorrexe; seta amarela, escassez citoplasmática; e seta azul, célula multinucleada. Objetiva 20X.



Fonte: Próprio autor

5.4 Morfologia celular após exposição de 48 horas à doxorubicina, *Viscum album* e associação doxorubicina + *Viscum album*

O grupo controle apresentou morfologia variada, com células predominantemente fusiformes e poligonais, contendo citoplasma basofílico, discretamente compactado e com prolongamentos citoplasmáticos finos. Os núcleos demonstraram-se ovais a arredondados, com frequência maior de eucromatina comparado a heterocromatina. Alterações nucleares foram observadas como discreta presença de picnose, cariorrexe e hiperchromasia e moderada presença de vacuolização. Ainda, foram observadas discretas figuras mitóticas e células multinucleadas com moderada lise celular conforme apresenta a tabela 3 (Figura 10A).

O grupo de células expostas a *Viscum album* L. apresentaram morfologia

variada, com células predominantemente fusiformes e poligonais, contendo citoplasma basofílico, moderadamente compactado e com prolongamentos citoplasmáticos finos. Os núcleos demonstraram-se ovais a arredondados, com frequência maior de eucromatina comparado a discreta heterocromatina. Alterações nucleares foram observadas como discreta presença de picnose, cariorrexe e hipercromasia e moderada presença de vacuolização. Ainda, foram observadas discretas figuras mitóticas, lise celular e células multinucleadas conforme apresenta a tabela 3 (Figura 10B).

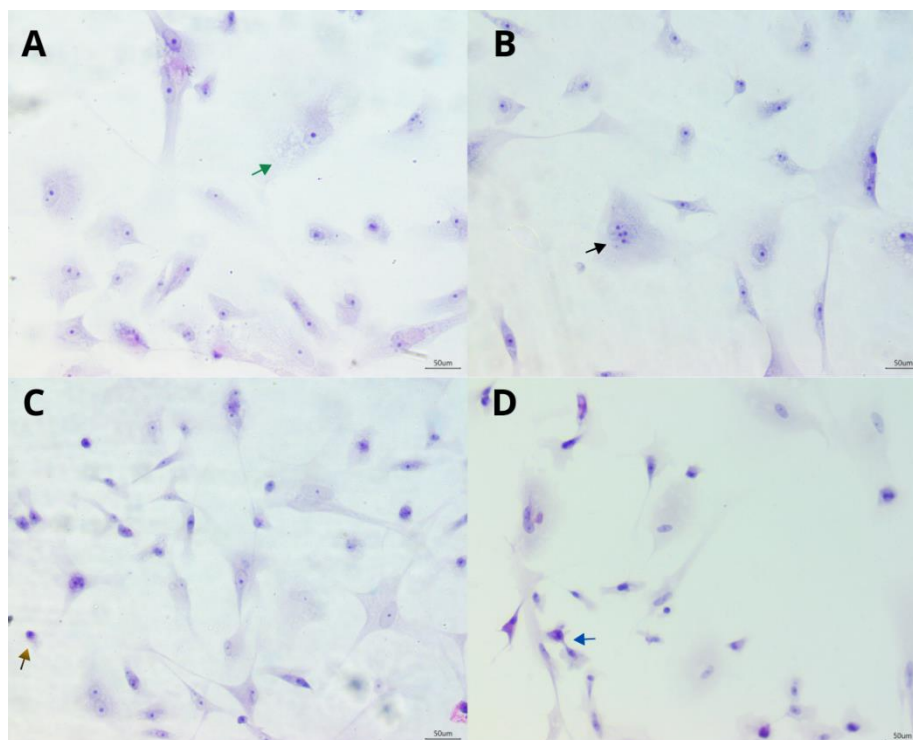
O grupo de células expostas à doxorrubicina apresentaram morfologia variada, com células predominantemente arredondadas, fusiformes e poligonais, contendo citoplasma basofílico, altamente compactado e com prolongamentos citoplasmáticos finos. Os núcleos demonstraram-se ovais a arredondados, com alta frequência de eucromatina e heterocromatina. Alterações nucleares foram observadas como alta presença de picnose e discreta cariorrexe além de alta hipercromasia e vacuolização. Ainda, foram observados discretas figuras mitóticas, lise celular e moderadas células multinucleadas conforme apresenta a tabela 3 (Figura 10C).

O grupo de células expostas à associação de doxorrubicina + *Viscum album* L. apresentaram morfologia variada, com células predominantemente fusiformes e poligonais, contendo citoplasma eosinofílico, altamente compactado e com prolongamentos citoplasmáticos. Os núcleos demonstraram-se ovais a arredondados, com frequência maior de eucromatina comparado a moderada heterocromatina. Alterações nucleares foram observadas como alta presença de picnose e cariorrexe além de alta hipercromasia e vacuolização. Ainda, foram observados discretas figuras mitóticas e moderada lise celular e células multinucleadas conforme apresenta a tabela 3 (Figura 10D).

Tabela 3 - Principais achados morfológicos encontrados em células de linhagem primária de adenomioepitelioma expostas a: grupos controle (sem tratamento), *Viscum album* L. (VA), Doxorrubicina (Doxo) e associação *Viscum album* L. + Doxorrubicina (VA + doxo) após exposição de 48 horas. Resultados apresentados como: ausência (0), ocorrência discreta (1-6: +), ocorrência moderada (6-12: ++) e ocorrência alta (≥ 13 : +++).

	Controle	VA	Doxo	VA + doxo
Morfologia				
Arredondadas	+	0	+++	0
Fusiformes	+++	+	+++	+
Poligonais	+++	+++	+++	+++
Escassez				
Citoplasmática	+	++	+++	+++
Vacuolização	++	++	+++	+++
Forma nuclear				
Ovais	+++	+++	+++	+++
Alongados	++	++	++	++
Cromatina				
Heterocromatina	++	+	+++	++
Eucromatina	+++	+++	+++	+++
Núcleos				
hipercromáticos	+	+	+++	+++
Nucléolos	+++	+++	+++	+++
Alterações nucleares				
Cariorrexe	+	+	+	+++
Picnose	+	+	+++	+++
Lise celular	++	+	+	++
Figuras mitóticas	+	+	+	+
Células				
multinucleadas	+	++	++	++

Figura 10 - Fotomicrografia evidenciando as alterações morfológicas encontradas em células de adenomioepitelioma maligno canino expostas a *Viscum album* L, Doxorubicina e associação em 48h. A – *Viscum album* L.; B - Doxorubicina; C - Associação; D – Grupo controle. As setas indicam algumas das alterações celulares encontradas: seta verde, vacuolização; seta preta, cariorrexe; seta amarela, escassez citoplasmática; e seta azul, núcleos hipercromáticos. Objetiva 20X.



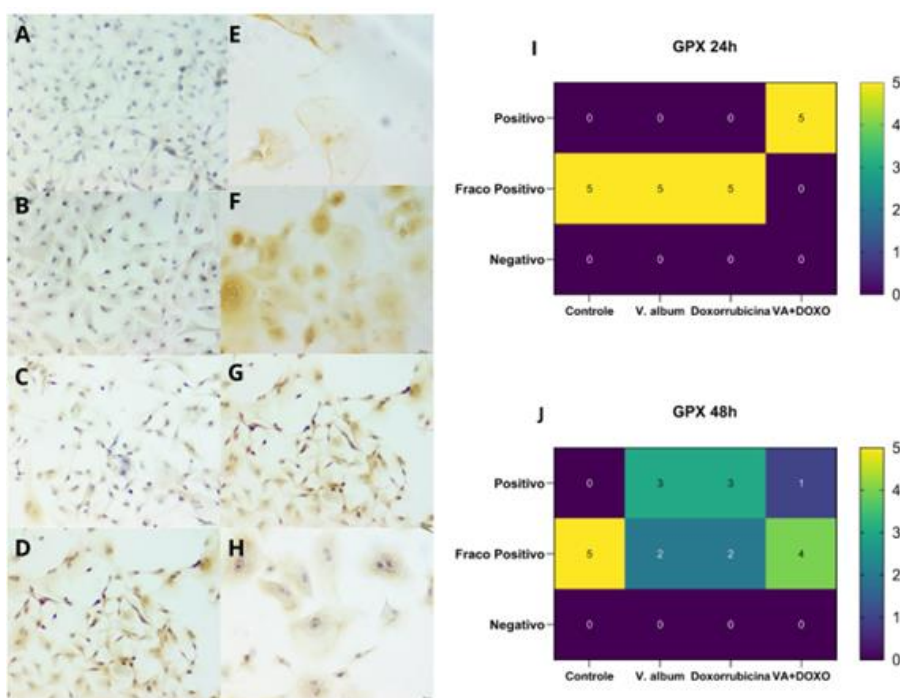
Fonte: Próprio autor.

5.5 Análise do escore de expressão de GPX, BAX e BCL-XL após exposição de 24 e 48h a doxorubicina, *Viscum album* L. e associação doxorubicina + *Viscum album* L.

Ao analisar o escore de expressão citoplasmática da proteína GPX nas células de linhagem primária de adenomioepitelioma maligno canino após 24h de exposição aos quimioterápicos preconizados nesse estudo, observou-se que a exposição à associação de *Viscum album* L. com doxorubicina influenciou significativamente para que as células apresentassem escore positivo da proteína GPX ($p = 0,0001$), enquanto observou-se maior tendência do escore de expressão fraco positivo de GPX nas células do grupo controle, assim como naquelas dos grupos *Viscum album* L. e doxorubicina, ambas isoladas. Ao analisar o escore de expressão da proteína GPX

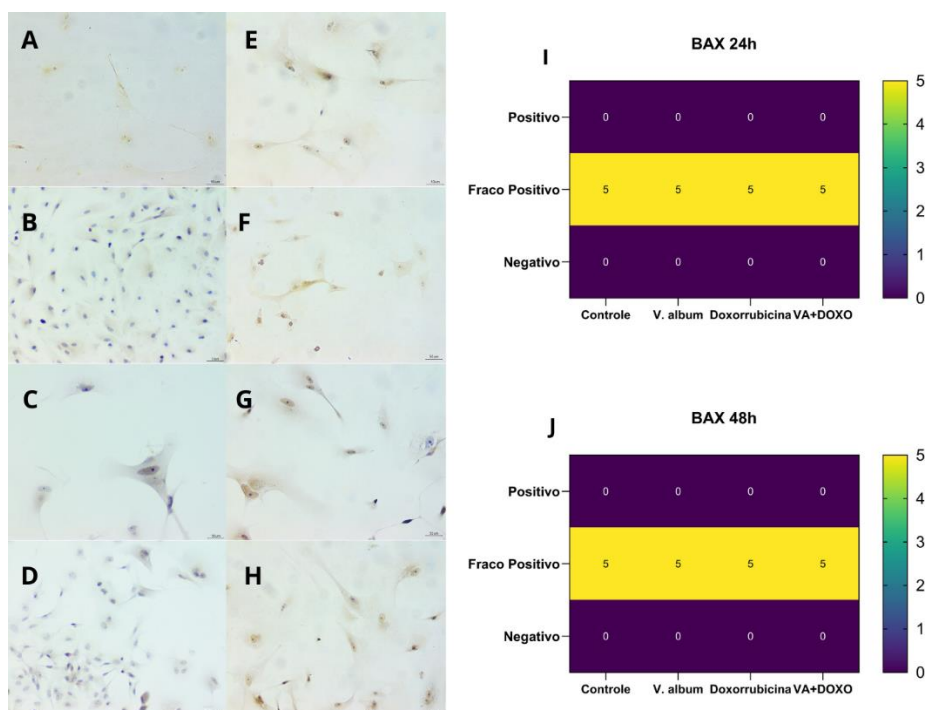
após 48h de exposição aos quimioterápicos, verificou-se que o grupo controle predominou o escore fraco positivo, ao passo que os fármacos isolados proporcionaram maior frequência do escore de expressão positivo, sendo que o grupo associação diminuiu significativamente o escore de expressão para fraco positivo ($p = 0,0001$) (Figura 11).

Figura 11 - Análise da expressão proteica citoplasmática de GPX em linhagem celular primária de adenomioepitelioma maligno canino, após 24h e 48h de exposição a *Viscum album* L., doxorrubicina e Associação destas. Em 24h, nota-se semelhança no escore de expressão fraco positivo de GPX nos grupos controle (A), *Viscum album* L. (B) e doxorrubicina (C), enquanto o grupo associação (D) influenciou significativamente no escore de expressão positivo. Em 48 horas, o grupo controle (E) permaneceu com o escore de expressão fraco positivo, seguido de modulação expressão para escore positivo nos grupos *Viscum album* L. (F) e doxorrubicina (G), enquanto o grupo associação (H) predominou o escore fraco positivo diminuindo significativamente a intensidade de expressão da proteína. I) *Heatmap* da distribuição dos o escores de expressão de GPX em 24h. J) *Heatmap* da distribuição dos escores de expressão de GPX em 48h. IHQ anti-GPX. Objetiva 20X.



A análise do escore de expressão da proteína pró-apoptótica BAX revelou que a exposição aos quimioterápicos testados nesse estudo não alteram significativamente a intensidade de expressão dessa proteína ($p > 0,05$), com predominância do escore fraco positivo em todos os grupos estudados em 24 e 48h (Figura 12).

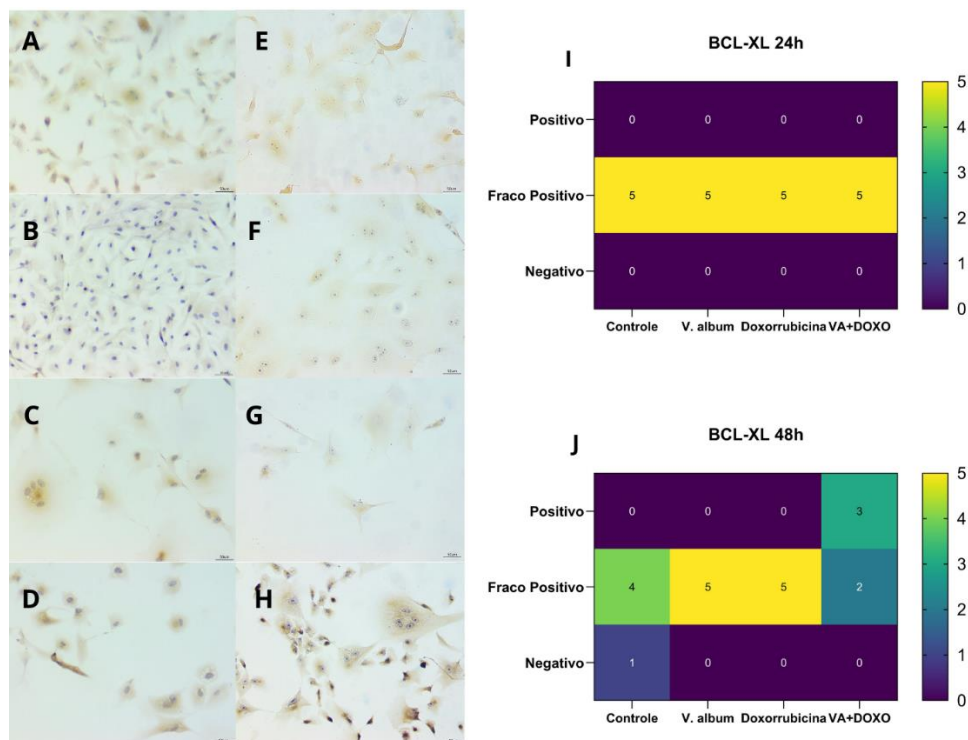
Figura 12 - Análise da expressão proteica citoplasmática de BAX em linhagem celular primária de adenomioepitelioma maligno canino, após 24h e 48h de exposição a *Viscum album* L., doxorrubicina e associação destas. Em 24h, nota-se semelhança no escore de expressão fraco positivo de BAX nos grupos controle (A), *Viscum album* L. (B) e doxorrubicina (C), e grupo associação (D). Em 48 horas, o grupo controle (E) assim como os demais grupos, *Viscum album* L. (F), doxorrubicina (G), e grupo associação (H) permaneceu o escore fraco positivo demonstrando que nesse estudo os tratamentos não alteram significativamente a intensidade de expressão dessa proteína em 24/48h. I) *Heatmap* da distribuição dos escores de expressão de BAX em 24h. J) *Heatmap* da distribuição dos escores de expressão de BAX em 48h. IHQ anti-BAX. Objetiva 20X.



Fonte: Próprio autor.

Para a proteína BCL-XL o escore fraco positivo foi expresso em todos os grupos no tempo 24h, não havendo influência significativa dos quimioterápicos na intensidade de expressão dessa proteína ($p > 0,05$). Ao prolongar o tempo de exposição para 48h, observou-se majoritariamente nos grupos controle, *Viscum album* L. e doxorrubicina a expressão fraca positiva da proteína, enquanto o grupo contendo a associação dos compostos apresentou maior tendência do escore positivo (Figura 13).

Figura 13 - Análise da expressão proteica citoplasmática de BCL-XL em linhagem celular primária de adenomioepitelioma maligno canino, após 24h e 48h de exposição a *Viscum album* L., Doxorrubicina e Associação destas. Em 24h, nota-se semelhança no escore de expressão fraco positivo de BCL-XL nos grupos controle (A), *Viscum album* L. (B), Doxorrubicina (C) e associação (D) não demonstrando influência significativa. Em 48 horas, permaneceu o escore fraco positivo nos grupos controle (E), *Viscum album* L. (F), doxorrubicina (G) seguido de modulação expressão para escore positivo no grupo associação (H). I) *Heatmap* da distribuição dos escores de expressão de BCL-XL em 24h. J) *Heatmap* da distribuição dos escores de expressão de BCL-XL em 48h. IHQ anti- BCL-XL Objetiva 20X.

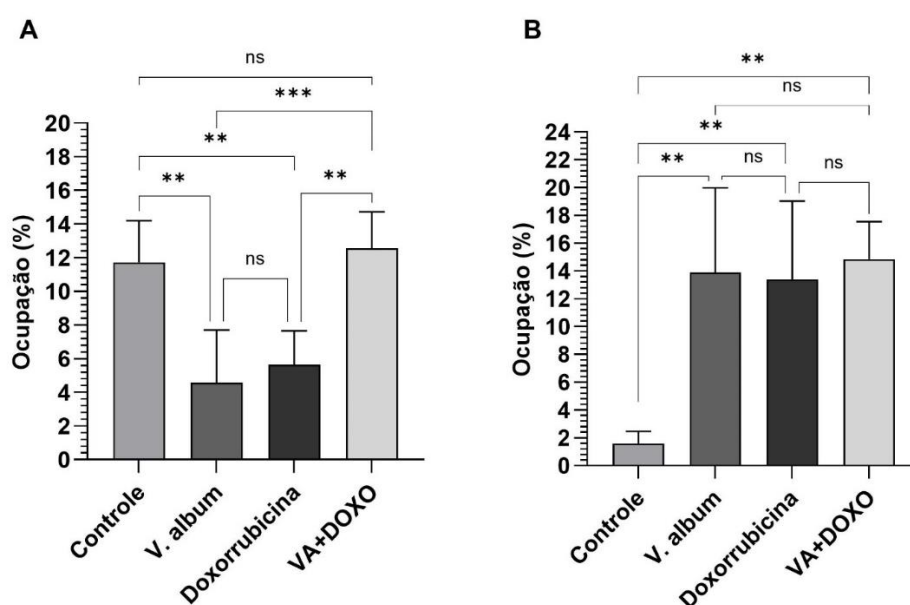


Fonte: Próprio autor.

5.6 Análise de ocupação de GPX, BAX e BCL-XL após exposição de 24 e 48 horas à doxorrubicina, *Viscum album* L. e associação doxorrubicina + *Viscum album* L.

O percentual de proteína GPX encontrado nas células de adenomioepitelioma maligno canino foi significativamente diferente após exposição de 24h ($p < 0,0001$) e 48h ($p < 0,0005$) aos quimioterápicos estipulados nesse estudo. Após 24h de exposição, células tumorais expostas a *Viscum album* L. e doxorrubicina reduziram significativamente a presença da proteína GPX em comparação ao grupo controle ($p = 0,0017$ e $p = 0,0066$, respectivamente), assim como em relação às células expostas à associação desses fármacos ($p = 0,0006$ e $p = 0,0022$, respectivamente) (Figura 14A). Em 48 horas, observou-se que GPX eleva significativamente sua ocupação citoplasmática nas células tumorais expostas a *Viscum album* L., doxorrubicina e associação em relação ao grupo controle ($p = 0,0021$, $p = 0,0031$ e $p = 0,0011$, respectivamente), não havendo distinção entre os grupos compostos por quimioterápicos (Figura 14B).

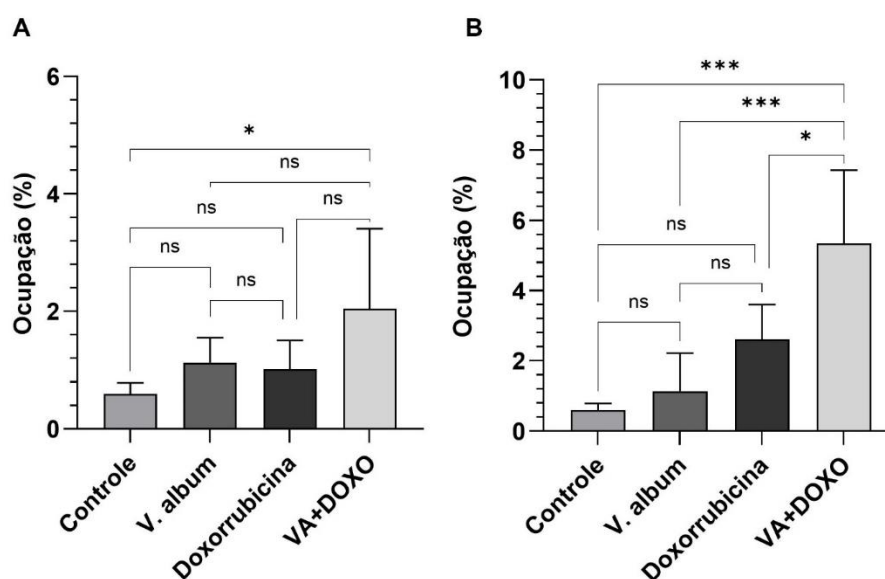
Figura 14 - Percentual de ocupação da proteína GPX em linhagem celular primária de adenomioepitelioma maligno canino após 24h (A) e 48h (B) de exposição a *Viscum album* L., doxorrubicina e Associação dessas. A) Após 24h de exposição ocorreu redução significativa da proteína GPX em células tratadas com *Viscum album* L. e com doxorrubicina; ** ($p < 0,05$), *** ($p < 0,005$). B) Após 48h de exposição ocorreu aumento significativo da proteína GPX em células submetidas a todos os tratamentos preconizados; ** ($p < 0,005$). Teste ANOVA para um critério seguido do Teste de Tukey, $\alpha = 5\%$.



Fonte: Próprio autor.

Ao analisar a ocupação da proteína BAX após 24h de exposição aos quimioterápicos, verificou-se haver diferença significativa na ocupação proteica ($p = 0,0041$), principalmente devido efeito da associação de doxorrubicina e *Viscum album* L. que elevou significativamente a presença de BAX em células de adenomioepitelioma maligno canino em comparação ao grupo controle ($p = 0,0358$) (Figura 15A). Os resultados obtidos após 48h de exposição também mostraram diferença significativa na ocupação proteica ($p = 0,0001$), com aumento significativo da ocupação de BAX após exposição à associação ($p = 0,0001$) em relação ao grupo controle, além de um aumento da proteína nos grupos isolados *Viscum album* L. ($p = 0,0004$) e doxorrubicina ($p = 0,0178$) em relação ao grupo associação (Figura 15B).

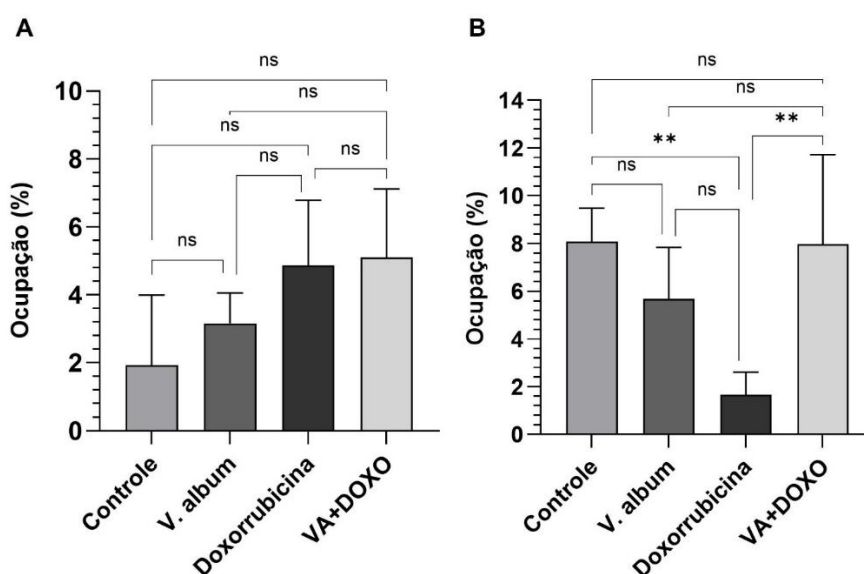
Figura 15 - Percentual de ocupação da proteína BAX em linhagem celular primária de adenomioepitelioma maligno canino após 24h (A) e 48h (B) de exposição a *Viscum album* L., doxorrubicina e Associação dessas. A) Houve aumento da ocupação de BAX após 24h de exposição à associação de *Viscum album* L. com doxorrubicina; * ($p < 0,05$). B) Após 48h de exposição ocorreu aumento significativo da proteína BAX em células submetidas a todos os tratamentos preconizados; * ($p < 0,05$), *** ($p < 0,0005$). Teste ANOVA para um critério seguido do Teste de Tukey, $\alpha = 5\%$.



Fonte: Próprio autor.

A ocupação citoplasmática de BCL-XL após 24h de exposição não sofre influência dos quimioterápicos testados nesse estudo ($p > 0,05$) (Figura 16A). No entanto, após 48 horas de exposição, os resultados apontaram diferença significativa entre os percentuais de ocupação de BCL-XL ($p = 0,0024$), sendo que a exposição à doxorrubicina diminui a ocupação da proteína em comparação ao grupo controle ($p = 0,0054$), assim como em relação à associação ($p = 0,0038$) (Figura 16B).

Figura 16 - Percentual de ocupação da proteína BCL-XL em linhagem celular primária de adenomioepitelioma maligno canino após 24h (A) e 48h (B) de exposição a *Viscum album* L., doxorrubicina e Associação dessas. A) Nenhuma alteração na ocupação de BCL-XL foi observada após 24h de exposição aos quimioterápicos. B) A exposição a doxorrubicina reduz significativamente o percentual de ocupação de BCL-XL após 48h de exposição; ** ($p < 0,005$). Teste ANOVA para um critério seguido do Teste de Tukey, $\alpha = 5\%$.



Fonte: Próprio autor.

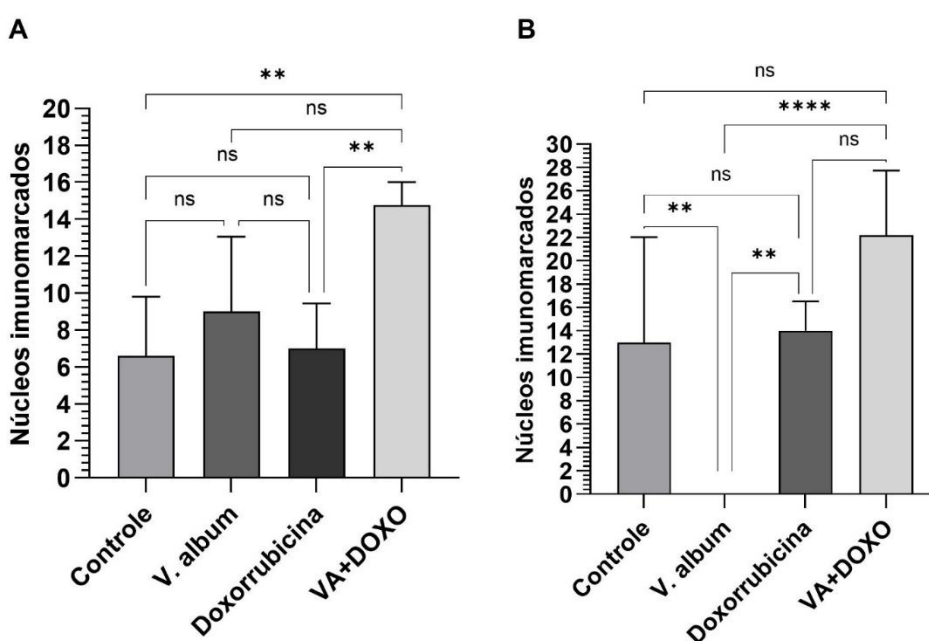
5.7 Análise da imunomarcacão nuclear de OGG e REF-1 após exposição de 24 e 48 horas à doxorrubicina, *Viscum album* e associação doxorrubicina + *Viscum album*

A análise da imunomarcacão nuclear de OGG mostrou diferença significativa no número de núcleos apresentando esse marcador biológico após exposição aos quimioterápicos estipulados nesse estudo, tanto em 24h ($p = 0,0045$) quanto 48h ($p < 0,0001$). Após 24h, a exposição à associação doxorrubicina e *Viscum album* L. aumentou significativamente o número de núcleos OGG-imunopositivos em relação ao grupo controle ($p = 0,0053$) e ao grupo de células expostas a doxorrubicina ($p = 0,0078$) (Figura 17A).

Ao aumentar o tempo de exposição em 48 horas, as células expostas a *Viscum album* L. diminuíram significativamente a expressão da proteína em comparação ao

grupo controle ($p = 0,0081$), doxorrubicina isolada ($p = 0,0045$) e associação ($p < 0,0001$) (Figura 17B).

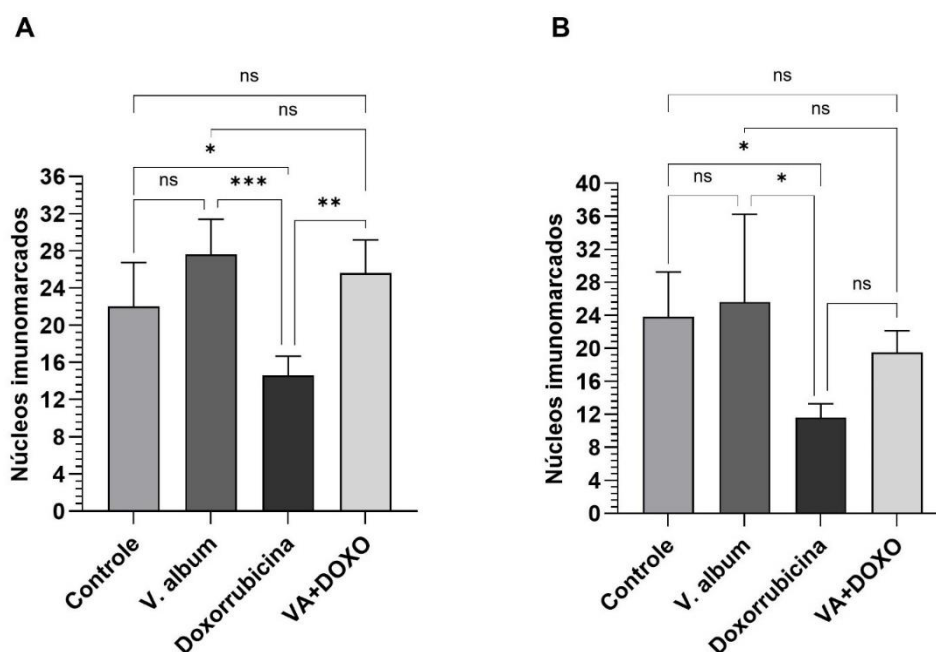
Figura 17 - Imunomarcção nuclear da proteína OGG em linhagem celular primária de adenomioepitelioma maligno canino após 24h (A) e 48h (B) de exposição a *Viscum album* L., doxorrubicina e associação dessas. A) Após 24h, a associação dos quimioterápicos aumentou significativamente a presença de OGG; ** ($p < 0,005$). B) A exposição a *Viscum album* L. reduz significativamente a presença de OGG em relação aos demais grupos; ** ($p < 0,005$), **** ($p < 0,0001$). Teste ANOVA para um critério seguido do Teste de Tukey, $\alpha = 5\%$.



Fonte: Próprio autor.

A análise da proteína REF-1 revelou que a exposição aos quimioterápicos utilizados nesse estudo alteram a quantidade de núcleos expressando a proteína, após exposições de 24h ($p = 0,0002$) e 48h ($p = 0,0152$). Em 24h, doxorrubicina reduziu significativamente o número de núcleos expressando REF-1 em relação aos grupos controle ($p = 0,0264$), *Viscum album* L. ($p = 0,0002$) e associação ($p = 0,0011$) (FIGURA 18A). Em 48h, observou-se diminuição significativa de núcleos imunomarcados por REF-1 após exposição a doxorrubicina em relação ao grupo controle ($p = 0,0371$) e *Viscum album* L. ($p = 0,0156$) (Figura 18B).

Figura 18 - Imunomarcagem nuclear da proteína REF-1 em linhagem celular primária de adenomioepitelioma maligno canino após 24h (A) e 48h (B) de exposição a *Viscum album* L., doxorrubicina e Associação dessas. A) Após 24h, a exposição a doxorrubicina reduziu significativamente a presença de REF-1; * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,005$), *** ($p < 0,0005$). B) A exposição a doxorrubicina reduz significativamente a presença de REF-1 ao controle e *Viscum album* L.; * ($p < 0,05$). Teste ANOVA para um critério seguido do Teste de Tukey, $\alpha = 5\%$.

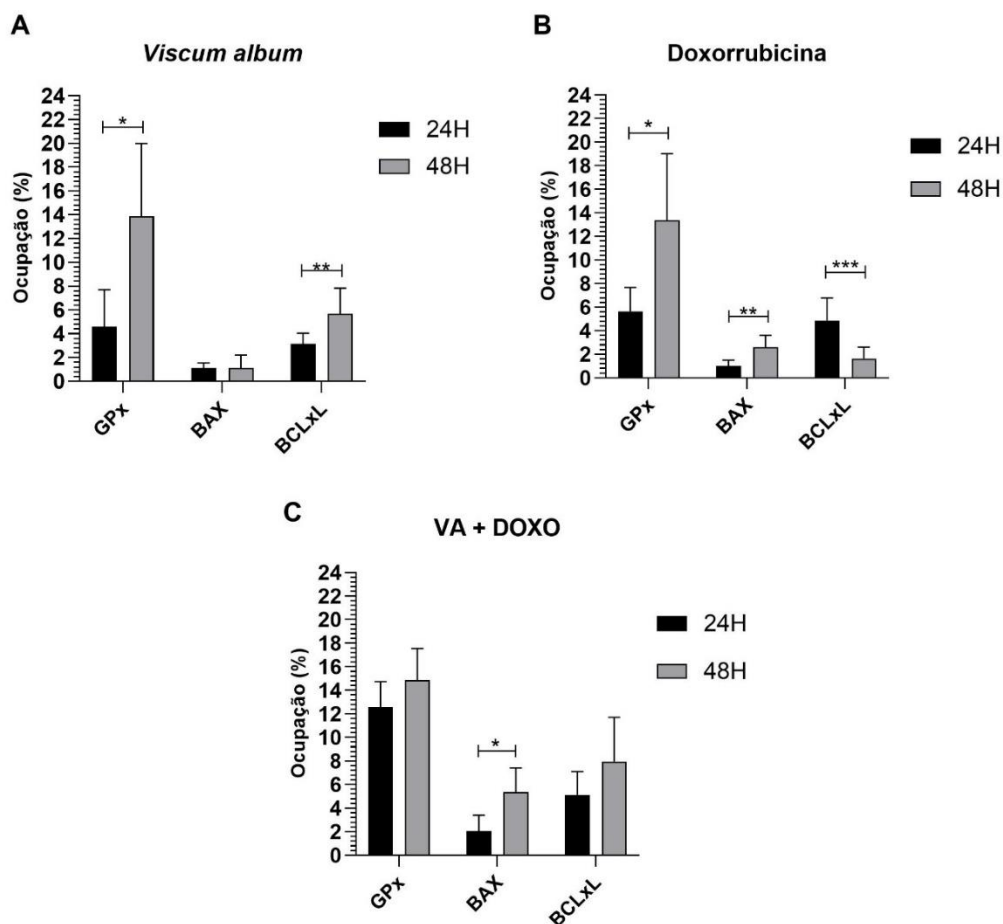


Fonte: Próprio autor.

5.8 Comparação do percentual de ocupação de GPX, BAX e BCL-XL entre 24 e 48 horas após exposição à *Viscum album* L., doxorrubicina e associação doxorrubicina e *Viscum album* L.

Células de adenomioepitelioma maligno canino expostas à *Viscum album* por 48h, aumentam significativamente a presença das proteínas GPX ($p = 0,0161$) e BCL-XL ($p = 0,0435$) quando comparadas ao tempo de 24h de exposição. O quimioterápico doxorrubicina aumentou o percentual de ocupação de GPX ($p = 0,0203$) e BAX ($p = 0,0123$) e diminuiu o percentual de ocupação da proteína antiapoptótica BCL-XL ($p = 0,0100$) em 48h comparada à 24h de exposição. Quando associados os quimioterápicos, apenas BAX apresentou aumento significativo em 48h de exposição em relação a 24h de exposição ($p = 0,0179$) (Figura 19).

Figura 19 - Análise comparativa da ocupação das proteínas GPX, BAX e BCL-XL em adenomioepitelioma maligno canino, entre os tempos de 24h e 48h após exposição a *Viscum album* L (A), doxorrubicina (B) e associação *Viscum Album* L. + doxorrubicina (C). * ($p < 0,05$). Teste t de comparação múltipla, $\alpha = 5\%$.

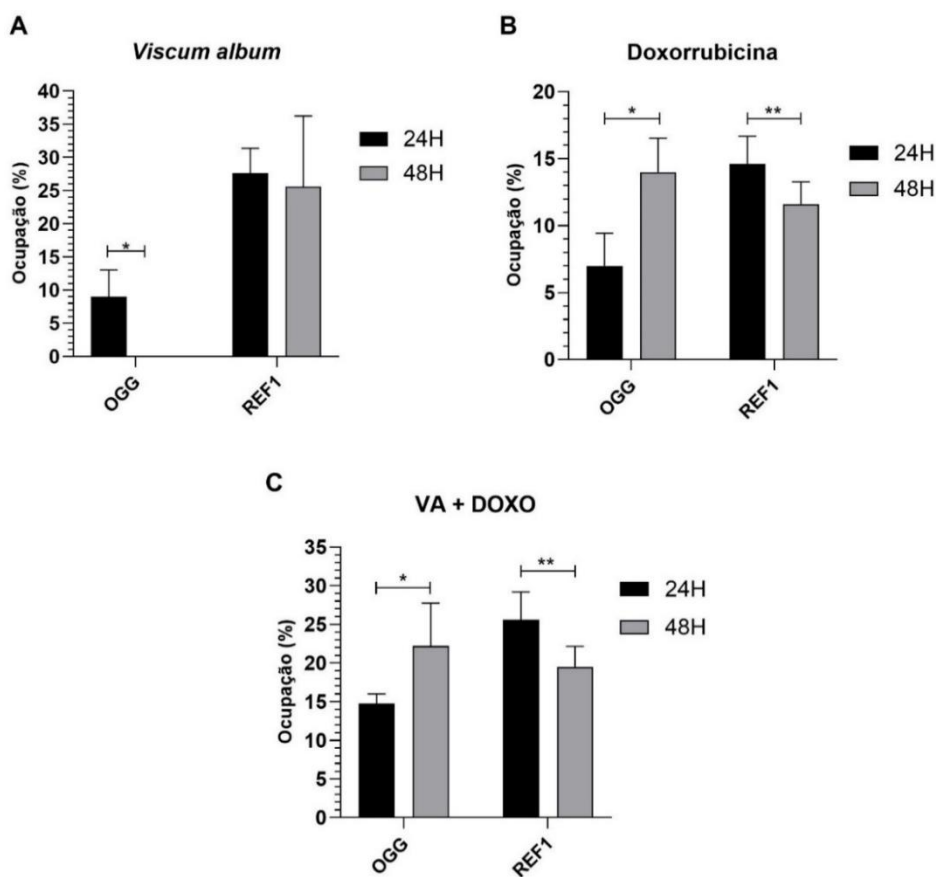


Fonte: Próprio autor.

5.9 Comparação de núcleos imunomarcados por OGG e REF-1 entre 24 e 48 horas após exposição à *Viscum album* L., doxorrubicina e associação doxorrubicina e *Viscum album* L.

As células submetidas ao tratamento com *Viscum album* L. apresentaram menor quantidade de núcleos marcados com a demonstraram diferenças significativas na marcação da proteína OGG em 48h em relação a 24h ($p = 0,0011$). O tratamento isolado de doxorrubicina por 48h induziu aumento da marcação de OGG ($p = 0,0011$) e diminuição da marcação de REF-1 ($p = 0,0359$) em relação a 24h. Quando associados os compostos, observou-se aumento da expressão da proteína OGG ($p = 0,0353$) e diminuição da expressão de REF-1 ($p = 0,0253$) em 48h em comparação a 24h de exposição (Figura 20).

Figura 20 - Análise comparativa da ocupação das proteínas OGG e REF-1 em adenomioepitelioma maligno canino, entre os tempos de 24h e 48h após exposição a *Viscum album* L (A), doxorrubicina (B) e associação *Viscum album* L. + doxorrubicina (C). * ($p < 0,05$). Teste t de comparação múltipla, $\alpha = 5\%$.



Fonte: Próprio autor.

6. DISCUSSÃO

6.1 Morfologia celular após exposição de 24 e 48 horas à doxorrubicina, *Viscum album* L. e associação doxorrubicina + *Viscum album* L.

O adenomioepitelioma canino (AME) é um tipo de tumor mamário que apresenta características morfológicas complexas, devido à presença de diferentes tipos celulares. De forma geral, as células neoplásicas apresentam variação em tamanho, forma e organização, refletindo a natureza mista da neoplasia, que envolve componentes epiteliais e mioepiteliais (Cassali *et al.*, 2020). Essa diversidade celular pode ser observada tanto na análise microscópica de cortes histológicos quanto em preparações citológicas, como em imunistoquímica, contribuindo para o diagnóstico certo e compreensão do comportamento biológico do tumor (Cassali *et al.*, 2020).

Em 24 horas, a doxorrubicina apresentou maior frequência de células arredondadas, heterocromatina e figuras mitóticas em comparação aos demais grupos. Além disso, promoveu um aumento na escassez citoplasmática e vacuolização em relação ao grupo controle, assim como intensificou a cariorrexe, picnose e a quantidade de células multinucleadas. Após 48 horas, alterações semelhantes foram observadas, com o quimioterápico mantendo o aumento da frequência de células arredondadas e heterocromatina em comparação aos outros grupos, além de intensificar a escassez citoplasmática em relação ao controle. Outros achados incluem maior hipercromasia, vacuolização e picnose em comparação ao grupo controle e ao *Viscum album* L. Além disso, a escassez citoplasmática e a vacuolização tornaram-se ainda mais evidentes em relação ao período de 24 horas sugerindo que seu efeito citotóxico se intensifica com a exposição prolongada. Tais alterações morfológicas são compatíveis com estresse celular e possível apoptose, através principalmente do aumento da frequência de células arredondadas, escassez citoplasmática e vacuolização em ambos os tempos (Chen *et al.*, 2024). A presença de células arredondadas, cariorrexe e picnose sugere que a doxorrubicina influencia a perda da adesão celular, possivelmente ativando mecanismos apoptóticos, conforme descrito por Voss e Strasser (2020) ou até mesmo atuou diminuindo a proliferação, fato observado ao notar um aumento da heterocromatina em 24 e 48h.

Os dados morfológicos referentes aos tratamentos tanto isolado de doxorrubicina quanto em associação com *Viscum album* L. são consistentes com os de Sardão *et al.* (2009), que relataram que as alterações morfológicas em mioblastos, induzidas pela doxorrubicina, são dependentes da concentração e do tempo de exposição. Em baixas concentração (1 μ L) por 24 horas, observaram-se encolhimento celular e formação de bolhas na membrana, enquanto concentrações mais elevadas (5-50 μ L) levaram a vacuolização citoplasmática, arredondamento celular, desorganização dos nucléolos, aumento nuclear, condensação da cromatina e ruptura do envelope nuclear. Em 24/48h observou-se que a associação dos tratamentos aumentou principalmente a frequência da vacuolização e picnose comparado ao grupo controle e tratamentos isolados. Ainda, a lise celular aumentou a frequência na presença da doxorrubicina tanto isolada quanto em associação corroborando Sardão *et al.* (2009). Esses dados confirmam o potencial da doxorrubicina na indução da morte celular e apresenta potencialização de sua ação quando em associação com o fitoterápico estudado.

Em 24h observou-se que em relação ao encolhimento citoplasmático, as frequências nos grupos isolados dos tratamentos aumentaram comparado ao grupo controle e a associação dos tratamentos aumentou ainda mais comparado aos grupos isolados. Em 48h observou-se um aumento na frequência de células com encolhimento citoplasmático de células expostas a doxorrubicina isolada e em associação comparado ao grupo controle e *Viscum album* L. isolado. Nossos dados confirmam a indução de doxorrubicina isolada na indução do arredondamento celular tanto em 24/48h e ainda no encolhimento citoplasmático principalmente no que se refere ao tratamento associado. O mesmo foi observado em outros estudos como em linhagens celulares de mama humano MCF-7 e MDA-MB-231 expostas por 72 horas à doxorrubicina também identificaram diferenças morfológicas. Em MCF-7, foram observadas extensões celulares, células arredondadas e membranas celulares com extensas bolhas. Ao passo que em MDA-MB-231, as células sobreviventes ao tratamento apresentaram encolhimento, dispersão e formação de bolhas na membrana, além de encolhimento citoplasmático (Radwan *et al.*, 2016).

Além disso, Sharifi *et al.* (2015) demonstrou que em linhagens celulares mamárias humanas MCF-7 expostas a concentrações de 0,1 μ M, 0,5 μ M e 1,5 μ M de doxorrubicina por 24, 48 e 72 horas apresentou alterações morfológicas progressivas ao longo do tempo. Após o tratamento, as células tornaram-se arredondadas,

condensadas e destacadas da placa, com esses efeitos sendo mais acentuados conforme o aumento da concentração e do tempo de incubação. Dessa forma, nossos resultados sugerem que as alterações observadas induzem que a ação de doxorrubicina pode ser preferencialmente potencializada por *Viscum album* L. no presente estudo em 24/48h.

A escassez citoplasmática, lise celular e vacuolização foram mais evidentes quando as células de adenomioepitelioma maligno foram expostas à doxorrubicina e associação *Viscum album* L. + doxorrubicina, sugerindo a ativação de outros tipos de morte celular, como a autofagia, em resposta à disfunção mitocondrial (Li *et al.*, 2022). O estresse oxidativo gerado pela doxorrubicina pode contribuir para esse efeito (Bhatti; Bhatti; Reddy, 2017), promovendo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (Zhang *et al.*, 2023) visto que o fármaco consegue se acumular nas mitocôndrias das células e interfere na cadeia transportadora de elétrons, gerando alta produção de espécies reativas de oxigênio (Aryal; Rao, 2016). Nossos achados morfológicos são compatíveis com os dados imunohistoquímicos, indicando que as células podem estar explorando diferentes mecanismos de morte celular além da apoptose.

O mecanismo de ação da doxorrubicina envolve o dano ao DNA (Anjali Bisht *et al.*, 2024; Gherman *et al.*, 2023), ativando apoptose (Park *et al.*, 2023) e autofagia (Koleini; Kardami, 2017) como respostas ao estresse celular. No entanto, a vacuolização citoplasmática também pode indicar outro tipo de morte celular, como a paraptose, caracterizada pela vacuolização do citoplasma, inchaço do retículo endoplasmático e mitocôndrias, e ausência de ativação de caspases (Chang *et al.*, 2024).

Os resultados em 24 horas indicaram que o extrato de *Viscum album* L. induziu alterações morfológicas menos agressivas que a doxorrubicina, mantendo um comportamento semelhante ao grupo controle, mas ainda assim, com sinais de estresse celular. O aumento da cariorrexe, picnose e vacuolização em 24 horas, bem como da escassez citoplasmática e das células multinucleadas em 24 e 48 horas, sugere um leve efeito citotóxico e modulador na morfologia celular de AME. Diferente da doxorrubicina, *Viscum album* L. parece atuar em AME em vias metabólicas celulares do que diretamente no DNA, inibindo a proliferação celular (Park *et al.*, 2023).

Os achados morfológicos do presente estudo indicam que a combinação de *Viscum album* L. com doxorrubicina intensifica a lise celular e a morte celular

programada, sugerindo um efeito sinérgico no tratamento do adenomioepitelioma maligno. Esse efeito é evidenciado pelo aumento das alterações nucleares, indicando que *Viscum album* L. pode potencializar o efeito citotóxico da doxorrubicina, interferindo no ciclo celular e impedindo a mitose completa. Para além, outros tipos de morte celulares podem estar sendo desencadeados necessitando de estudos mais aprofundados que busquem evidenciar tais achados.

6.1 Expressão proteica de GPX, BAX e BCL-XL

No que tange a expressão proteica citoplasmática de GPX, esse estudo revelou que essa proteína tem sua expressão modulada por *Viscum album* L. e doxorrubicina, sejam isoladas ou associadas, com modificação considerável de expressão após 48h de exposição aos fármacos, especialmente quando utilizados isoladamente em relação ao grupo controle.

Estudos indicaram que os compostos presentes no *Viscum album* L. contribuem para a atividade antioxidante, especialmente em extratos metanólicos, hidroetanólicos (Pietrzak; Nowak, 2021; Nicoletti, 2023a; Yadang *et al.*, 2022) e flavonoides (Zhang *et al.*, 2021). Uma importante via regulatória de defesa intracelular contra o estresse oxidativo, é o fator de transcrição NRF-2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) que em níveis normais permanece acoplada a KEAP-1. Ao receber estímulos causados pelo estresse oxidativo principalmente, NRF-2 se transloca para o núcleo e ativa diferentes enzimas que atuam na linha de defesa contra EROs incluindo GPX (Cui; Leng; Wang, 2019; Ngo; Duennwald, 2022). Dessa forma, sugere-se um efeito sinérgico na combinação *Viscum album* L. e doxorrubicina, uma vez que os resultados da expressão proteica de GPX no tratamento associado em 24h, diferiram dos tratamentos isolados no mesmo período. Estudos referentes a expressão da proteína NRF-2 devem ser realizados a fim de entender se a interação entre os compostos pode ter potencializado a ativação de NRF2, aumentando a expressão proteica de GPX positivamente como mecanismo de defesa celular, permitindo que as células tumorais resistam à apoptose induzida pelo estresse oxidativo do tratamento combinado (Ngo; Duennwald, 2022) justificando assim, o resultado significativo referente a expressão positiva da proteína no tratamento associado, dessa forma, corroborando Stan *et al.* (2013) onde observaram em células

tumorais de camundongos à amplificação das atividades da xantina oxidase e da peroxidase através da associação de *Viscum album* L e doxorubicina.

Um estudo *in vivo* utilizando camundongos e que analisou a combinação de *Viscum album* L. e quercetina, revelou redução significativa nos níveis de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, além de glutathione-S-transferases e glutathione reduzida (Sekeroğlu; Aydin; Sekeroğlu, 2011). Um tratamento *in vivo* com doxorubicina demonstrou subexpressar genes GPX em mulheres com carcinoma ductal invasivo. O resultado sugere que altos níveis de expressão proteica de GPX podem estar relacionados ao desenvolvimento da quimiorresistência, reduzindo o efeito modulador do estresse oxidativo produzido por doxorubicina (Jardim *et al.*, 2013).

Neste estudo, a proteína GPX reduziu significativamente sua ocupação após 24h de exposição aos tratamentos isolados de doxorubicina e *Viscum album* L., em comparação ao grupo controle e associação. Tais achados corroboram o descrito anteriormente por Sekeroğlu; Aydin; Sekeroğlu (2011) e Jardim *et al.* (2013) e sugere menor capacidade de neutralização de espécies reativas de oxigênio na linhagem celular primária de adenomioepitelioma maligno canino utilizada nesse estudo, nas primeiras 24h pós exposição.

Ainda, um estudo indicou que os compostos presentes em doxorubicina podem gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), resultando em danos oxidativos celulares (Antonucci *et al.*, 2021), enquanto outro evidenciou que extratos proteicos de *Viscum album* L. sobre o câncer cervical induzem a produção de EROs, com um aumento significativo entre 24 e 48h (Mavrikou *et al.*, 2019). Embora *Viscum album* L. e doxorubicina sejam capazes de produzir EROs em células cancerosas (Antonucci *et al.*, 2021; Mavrikou *et al.*, 2019), a baixa ocupação dessa proteína antioxidante pode estar relacionada à menor intensidade dos danos celulares devido ao curto tempo de exposição. Acredita-se que 24 horas não tenham sido suficientes para aumentar significativamente os danos induzidos por EROs nos tratamentos isolados, o que impediria a ativação de genes responsáveis pela síntese da proteína, justificando o escore fraco positivo em comparação ao grupo controle, bem como a menor ocupação citoplasmática da GPX. A exposição isolada das células a esses tratamentos sugere um mecanismo intrínseco de regulação negativa da proteína, inibindo sua expressão proteica e redução antioxidante, favorecendo assim a morte celular programada mediada pela produção de EROs.

Ainda, em 48 horas de exposição, tanto a ocupação citoplasmática quanto a expressão proteica de GPX demonstrou um aumento positivo nos tratamentos isolados em relação ao grupo controle, sugerindo que tanto a doxorrubicina quanto *Viscum album* L. podem induzir resposta citoprotetora dependente do tempo antes de atingirem um nível de toxicidade suficiente para apoptose. Isso pode ser justificado ao evidenciar o aumento transitório da GPX entre 24 e 48 horas, indicando que a sinalização para ativação de mecanismos antioxidantes se intensifica conforme a produção de EROs aumenta. Pilco-Ferreto e Calaf (2016) demonstraram que a doxorrubicina diminui o estresse oxidativo ao aumentar a produção de peróxido de hidrogênio em linhagens de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231, com subsequente redução dos danos por EROS através do aumento de SOD-2. Isso sugere que a elevação da expressão proteica de GPX esteja relacionada a um mecanismo de tempo-resposta devido a produção de peróxido de hidrogênio produzida pelo tratamento, sendo observada tanto nos tratamentos isolados quanto no grupo de associação onde Stan *et al.* (2013) evidenciaram, em células tumorais de camundongos, melhora no efeito protetor de *Viscum album* L. quando combinado com doxorrubicina, além da diminuição na atividade da catalase e na amplificação das atividades da xantina oxidase e da peroxidase.

Em relação as proteínas que regulam a apoptose de via intrínseca, os resultados deste estudo indicaram um padrão linear na expressão proteica de BAX ao longo de 24 e 48 horas, sendo predominantemente fraco positivo. Apesar da expressão proteica baixa, o tratamento associado, apontou elevação da ocupação da proteína em relação ao grupo controle em 24h. O mesmo resultado foi observado em 48h, seguido da elevação da ocupação da proteína em relação aos tratamentos isolados de *Viscum album* L e doxorrubicina. Os resultados obtidos no presente estudo mediante ao tempo de exposição aos tratamentos, se diferem de um estudo realizado em células de leucemia K562, no qual a exposição prolongada à combinação de *Viscum album* L. e doxorrubicina levou ao aumento da expressão de marcadores apoptóticos precoces e tardios (Srdic-Rajic *et al.*, 2015), essa discordância pode ser atribuída à diferenças da natureza das espécies estudadas como linhagens celulares distintas, presença ou ausência de metodologias além de outros fatores biológicos que possibilitam respostas terapêuticas específicas de cada tipo celular estudado.

Um estudo *in vitro* em osteossarcoma demonstrou um efeito sinérgico da associação de *Viscum album* L e doxorrubicina na indução da apoptose (Kleinsimon

et al., 2017). No câncer de mama humano, pesquisas conduzidas em células Mcf-7, Bt-474 e Hcc-1428 envolvendo os compostos em 24/48 horas também evidenciaram um alto potencial dessa combinação para a indução da morte celular apoptótica (Park *et al.*, 2023). O presente estudo observou um aumento na ocupação da proteína pró-apoptótica especialmente em associação com *Viscum album* L. e doxorrubicina comparado ao controle em 24/48h. Nossos resultados sugerem, que *Viscum album* L. possa potencializar doxorrubicina, sugerindo um efeito sinérgico dependente de tempo-resposta que contribuem na ocupação da proteína em adenomioepitelioma canino maligno em 24/48H sendo o efeito sinérgico mais evidente em 48h devido, possivelmente à acumulação de dano celular e possível tentativa de ativação apoptótica.

Estudos, relatam que a exposição à doxorrubicina resulta em regulação positiva na expressão de BAX em células MCF-7. (Pilco - Ferreto e Calaf, 2016; Sharifi *et al.*, 2015) e MDA-MB-231 (Pilco - Ferreto e Calaf, 2016). Nossos estudos isolados diferem das pesquisas mencionadas, pois tanto no que tange a ocupação e expressão proteica, onde proteína não foi aumentada no tratamento isolado de doxorrubicina, porém, é sabido que a associação entre *Viscum album* L. e doxorrubicina pode potencializar seus efeitos farmacológicos segundo estudos *in vitro* de osteossarcoma (Kleinsimon *et al.*, 2017) e em linhagem celular mamária MCF-7 (Park *et al.*, 2023). Tais diferenças podem ser explicadas devido á diferença celular das células estudadas justificando os comportamentos diferentes. Dessa forma, acredita-se que a associação dos compostos, intensifica o efeito pró-apoptótico da doxorrubicina e *Viscum album* L. isolada favorecendo a longo prazo a apoptose, porém estudos mais completos precisam ser desenvolvidos a fim de elucidar os resultados obtidos, visto que, *Viscum album* L. demonstrou atuar na regulação positiva de proteínas pró-apoptóticas como BAX e negativamente sobre proteínas anti-apoptóticas como BCL-2, BCL2L1, MCL1 e XIAP contribuindo para liberação do citocromo c e a ativação de caspases que levam a apoptose (Szurpnicka; Kowalczyk; Szterk, 2020).

Um estudo em células de câncer de mama humano MCF-7 (receptor de estrogênio positivo) e MDA-MB231 (receptor de estrogênio negativo) demonstrou que a associação do visco coreano (*V. album* var. *Coloratum*) pertencente a uma subespécie do *Viscum album* L. em combinação com doxorrubicina, apresentou um forte efeito sinérgico demonstrado na inibição do crescimento celular, em comparação aos tratamentos isolados. Além disso, BAX, BIK e PUMA, foram aumentadas e BCL-

2 foi inibido em células MCF-7 quando os medicamentos foram combinados (Hong; Kyung; Lyu, 2014) corroborando o presente estudo onde em 48 horas houve o aumento da ocupação de BAX, porém, diferindo dos resultados apresentados da proteína BCL-XL que teve tendência ao escore positivo nos tratamentos em 48 horas.

No presente estudo observou-se diminuição da expressão proteica da proteína BCL-XL em 48h em células expostas à doxorrubicina quando comparada ao grupo controle, *Viscum album* L. e associação. Resultados semelhantes foram relatados em pesquisas com linhagens celulares de câncer de mama humano, principalmente MCF-4 que demonstraram diminuição da expressão de BCL-2 e regulação negativa da proteína BCL-XL (Pilco- Ferreto; Calaf, 2016; Sharifi *et al.*, 2015) corroborando a ideia onde a doxorrubicina regula negativamente membros anti-apoptóticos da família BCL-2, a fim de beneficiar e induzir a apoptose. Dessa forma, acredita-se que a expressão proteica de BCL-XL em AME seja dependente do tempo de exposição à Doxorrubicina, reforçando sua influência em possível ativação de morte celular apoptótica.

Considerando os efeitos dos tratamentos neste estudo, sabe-se que tanto *Viscum album* L. quanto doxorrubicina são capazes de induzir a produção de EROs (Antonucci *et al.*, 2021; Mavrikou *et al.*, 2019). Ainda, o aumento desses radicais livres nas células pode desencadear diferentes vias de morte celular, sendo a apoptose uma das principais (Redza-Dutordoir; Averill-Bates, 2016). Embora seja um mecanismo de morte celular, outras vias também podem ser ativadas pelo aumento de EROS, como a ferroptose, iniciada pela peroxidação lipídica e caracterizada pelo aumento dependente de ferro em espécies reativas de oxigênio no câncer de mama humano (Karthikeyan Subburayan *et al.*, 2020; Ge *et al.*, 2023). Além disso, a autofagia pode ser ativada em resposta ao estresse oxidativo, promovendo a degradação de estruturas intracelulares e organelas (Li *et al.*, 2015; Wu; Sharma, 2023).

Outras vias de morte celular também podem ser envolvidas na eliminação de células neoplásicas mamárias, como a cuproptose (Jiang *et al.*, 2024) e a panoptose, que integra mecanismos como piroptose, apoptose e necroptose (Cui *et al.*, 2024). Dessa forma, entende-se que apesar de aumentar a ocupação da proteína nas células nos tratamentos isolados, a intensidade e ativação da proteína não sofre influência nos tempos estudados, levando a entender que em AME a apoptose intrínseca pode demorar a ser ativada e outros mecanismos de morte celular em vez da apoptose clássica possam estar sendo desencadeados, porém, ao associar os tratamentos

inicia-se uma tentativa de aumento de ocupação da proteína BAX para induzir, a longo prazo maior ativação das proteínas para desencadear vias apoptóticas, dessa forma, novos estudos precisam ser realizados, visando a combinação terapêutica em AME em 72 horas.

6.3 Análise de marcação nuclear de OGG e REF-1 24/ 48h e comparação entre os tempos

A literatura aponta a doxorrubicina atuando no processo de dano no DNA das células, sendo um mecanismo do fármaco para eliminação tumoral (Qiao *et al.*, 2020) especialmente em guaninas (Pillai *et al.*, 2016). Nas primeiras 24 horas, observou-se aumento na expressão da proteína OGG no núcleo de células expostas a combinação dos tratamentos *in vitro*, o que sugere a o acúmulo de danos 8-oxoG no DNA das células sobreviventes em comparação ao grupo controle e Doxorrubicina. Esse aumento de dano nuclear indica que a célula está tentando lidar com o estresse oxidativo e pode ser justificado pela potencialização da ação de doxorrubicina através da combinação com *Viscum album* L. visto que essa potencialização já foi demonstrada (Kleinsimon *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2023) justificando o aumento da imunomarcagem de OGG em células associadas ao fitoterápico e diferindo dos resultados isolados.

Os resultados obtidos em 48h apontaram doxorrubicina isolada e em associação com *Viscum album* L. aumentando OGG quando comparada com *Viscum album* L. O aumento da proteína pode ser justificado graças ao exacerbado dano oxidativo realizado pelo tratamento. Acredita-se que o tratamento isolado e associado com Doxorrubicina em AME seja dependente de tempo, visto que a expressão da proteína aumentou conforme tempo de exposição.

Em 48h ainda, foram observados diminuição de OGG em células tratadas com *Viscum album* L. em relação ao grupo controle. Um estudo *in vitro* em células de carcinoma cervical humano cujo DNA foi danificado por peróxido de hidrogênio, apontou a ação de *Viscum album* L. em 48 horas inibindo e protegendo contra danos ao DNA nuclear graças aos extratos metanólicos sugerindo que o composto possui capacidade de prevenir o dano oxidativo ao DNA mitocondrial e nuclear (Önay-Uçar *et al.*, 2012). Outro estudo apontou que *Viscum album* L. *in vitro*, consegue aumentar a produção IFN-gama e este pode atuar no processo de reparo de DNA em células

mononucleares do sangue periférico (PBMC) danificadas no câncer de mama (Kovacs, 2002). Assim, acredita-se que os compostos de *Viscum album* L. como flavonoides, lectinas e viscotoxinas que contém antioxidante (Nazaruk; Orlikowski, 2015; Szurpnicka; Kowalczyk; Szterk, 2020) atuaram em 48 horas protegendo o DNA contra danos oxidativos nas guaninas das células neoplásicas além de terem reduzido o estresse oxidativo, dessa forma, ao diminuir os danos nas guaninas entende-se que houve menor necessidade de ativação de OGG-1 (Pilco- Ferreto; Calaf, 2016; Sharifi *et al.*, 2015).

Acredita-se, portanto, que possa ocorrer dualidade na atividade de *Viscum album* L. onde ele contribua com espécies reativas de oxigênio a depender da concentração utilizada e tempo de exposição e sob certas condições e associações, proteja contra aos danos causados no DNA configurando uma importante linha de pesquisa a ser desenvolvida visando a dualidade de *Viscum album* L. em células cancerosas.

Ainda, foi observado diminuição significativa de REF-1 em células tratadas com doxorrubicina em 24/48h. O quimioterápico possui entre seus principais mecanismos de ação, inibição da transcrição, degradação proteossomica e indução do estresse oxidativo (Anjali Bisht *et al.* 2024). A proteína REF-1 por sua vez, além de atuar na via de reparo por excisão de bases ainda contribui na regulação de fatores de transcrição de NF-KB, AP-1 e P53 (Ando *et al.*, 2008; Fishel *et al.*, 2014). Dessa forma, acredita-se que a doxorrubicina possa afetar a regulação redox de REF-1 levando à acumulação de locais abásicos não processados, aumentando a instabilidade genômica e induzindo a morte celular.

Ainda, acredita-se que ao induzir estresse oxidativo em 48h através do tratamento isolado de doxorrubicina, houve muitos danos nas células tratadas. Sabe-se que o principal mecanismo de ação da doxorrubicina consiste em danos severos na fita dupla de DNA (Kciuk *et al.*, 2023), ao prolongar o contato do agente citotóxico, entende-se que consequentemente os níveis de danos aumentaram fazendo com que haja a superação da capacidade de reparo ao dano levando uma queda dos níveis de proteína de reparo, como a REF-1. Ainda, no cenário de 24h no tratamento associado, *Viscum album* L. pode ter atuado potencializando o estresse oxidativo ou até mesmo sensibilizando as células tumorais à doxorrubicina comprometendo ainda mais a capacidade de reparo celular observada no tratamento isolado de doxorrubicina. Tal Hipótese poderia ser explicada visto que estudos já demonstraram capacidade

sinérgica entre os fármacos em câncer de mama (Park *et al.*, 2023).

Vias apoptóticas estimuladas pela interação sinérgica dos compostos podem ter sido ativados em exposição prolongada, visto que ambos os fármacos possuem capacidade de indução da apoptose (Rivankar, 2014; Szurpnicka; Kowalczyk; Sztark, 2020) além de evidências onde o tratamento combinado de *Viscum album* L. e doxorrubicina aumentaram a expressão de marcadores apoptóticos, de acordo com um estudo em células de leucemia K562 (Srdic-Rajic *et al.*, 2015) e induziram a apoptose em um estudo *in vitro* em osteossarcoma (Kleinsimon *et al.*, 2017) além do câncer de mama humano em células Mcf-7 (Park *et al.*, 2023). Para além, a ausência de efeito sobre REF-1 no tratamento isolado de *Viscum album* L. pode indicar que a proteína não está diretamente envolvida na via de ação primária do extrato reforçando a importância da doxorrubicina como agente citotóxico para indução de dano que envolva REF-1. Dessa forma, *Viscum album* L. Isolado demonstra poder agir citotóxicamente em outras vias moleculares como a apoptose nesse tipo celular tumoral mas não necessariamente na ativação da via REF-1.

6.3 Comparação da resposta de GPX, BAX, BCL-XL, OGG e REF-1 nos tratamentos *Viscum album* L., doxorrubicina e associação VA+ doxorrubicina

Os resultados do tratamento isolado com *Viscum album* L., ao comparar os tempos de 24 e 48 horas em células de adenomioepitelioma maligno, sugerem possível estratégia de sobrevivência celular. Observou-se aumento significativo de GPX e BCL-XL em 48 horas, acompanhado pela redução na expressão proteica de OGG, indicando possível resistência ao fitoterápico e evasão da apoptose.

No presente estudo, sugere-se que, nas primeiras 24 horas, a produção de elétrons livres seja baixa e aumente com o tempo de exposição. Esse aumento pode ter estimulado a atividade da GPX, uma enzima antioxidante de primeira linha, que busca minimizar os danos oxidativos preservando a integridade nuclear (Jelic *et al.*, 2021). A redução na expressão proteica de OGG pode indicar menor ocorrência de danos ao DNA ou resposta adaptada a priorizar a proteção celular em vez da ativação do reparo. Além disso, o aumento da ocupação de BCL-XL reforça a hipótese de um efeito citoprotetor. Estudos sugerem que *Viscum album* L. pode modular vias antioxidantes e proteger contra danos ao DNA nuclear por meio de seus extratos

metanólicos (Önay-Uçar et al., 2012). Dessa forma, acredita-se que, em AME, *Viscum album* L. atue de forma *dual*, induzindo fracamente EROs, mas promovendo citoproteção a longo prazo.

A análise da expressão proteica também mostrou que, em 24 horas de tratamento, houve redução na expressão das proteínas GPX e REF-1, ambas relacionadas à resposta antioxidante e ao reparo celular. A doxorrubicina estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Anjali Bisht *et al.*, 2024), impactando a síntese de proteínas antioxidantes e de reparo, como GPX e REF-1. A diminuição de GPX pode estar associada ao aumento da peroxidação lipídica (Kazuya Tsubouchi *et al.*, 2019), comprometendo proteínas da matriz extracelular essenciais para a adesão celular, como integrinas e caderinas (Janiszewska; Primi; Izard, 2020).

Uma das propriedades mais relevantes de *Viscum album* L. é sua capacidade de modular vias biológicas essenciais. Especula-se que seus compostos possam atuar de maneira imunomoduladora, reduzindo o estresse oxidativo por meio da interferência no reparo por excisão de base, o que justificaria a diminuição da expressão proteica de OGG. Essa hipótese é sustentada por estudos que documentam o papel protetor de *Viscum album* L. na reparação do DNA (Kovacs, 2002). A diminuição da OGG sugere redução na capacidade das células de reparar danos específicos no DNA, principalmente aqueles causados por radicais livres. Essa queda na expressão da proteína pode levar ao acúmulo de danos genéticos (Wang *et al.*, 2021). Isso indica que, em resposta ao estresse celular, as células podem estar priorizando mecanismos antioxidantes de proteção, ao invés do reparo direto do DNA.

Por outro lado, os resultados do tratamento isolado com doxorrubicina indicam que, apesar da ativação inicial de mecanismos antioxidantes, as células foram direcionadas à apoptose. Acredita-se que o tratamento tenha induzido um aumento na produção de EROs (Anjali Bisht *et al.*, 2024; Gherman *et al.*, 2023), desencadeando um reforço do sistema antioxidante para neutralizar os radicais livres e proteger a célula, evidenciado pelo aumento de GPX. No entanto, apesar dessa resposta inicial, o acúmulo de danos nucleares tornou-se evidente, refletido no aumento de OGG, indicando estresse oxidativo significativo e a ativação da via de reparo por excisão de base para remover 8-oxoguanina (8-oxoG).

Entretanto, a redução na expressão proteica de REF-1, observada em 48 horas, sugere que a doxorrubicina comprometeu a eficácia desse reparo. REF-1 é essencial para processar os sítios abásicos gerados pela ação de OGG (Summa *et*

al., 2014), e sua diminuição pode ter levado a um reparo incompleto, resultando no acúmulo de lesões não corrigidas e na consequente instabilidade genômica. Esse cenário favoreceu a ativação da apoptose, evidenciada pelo aumento de BAX e pela redução de BCL-XL, caracterizando um desequilíbrio pró-apoptótico e a ativação da via intrínseca.

Esse achado é corroborado por Siqueira *et al.* (2024), que demonstraram, em estudos sobre câncer de mama, que a inibição de APE1/REF-1 por um inibidor redox (APX2009) reduziu as propriedades proliferativas, migratórias e invasivas das células tumorais, além de induzir apoptose. Estudos prévios também indicam que a doxorrubicina reduz a expressão de proteínas antiapoptóticas, como BCL-2 e BCL-XL, facilitando a ativação de BAX e promovendo apoptose (Pilco-Ferreto; Calaf, 2016; Sharifi *et al.*, 2015). Os dados do presente estudo corroboram essas evidências, visto que a expressão proteica de BCL-XL foi reduzida, enquanto a de BAX aumentou em resposta ao tratamento com doxorrubicina.

A associação de *Viscum album* L. e doxorrubicina mostrou um aumento significativo na ocupação de BAX e OGG, além de redução expressiva de REF-1 em 48 horas. Esses resultados sugerem que o estresse oxidativo se intensificou nesse período, levando a um aumento da apoptose devido à redução da capacidade de reparo. O aumento de OGG indica que o tratamento conjunto gerou um nível elevado de estresse oxidativo e lesões no DNA, possivelmente devido à interação da doxorrubicina com o material genético. Além disso, a diminuição de REF-1 pode ter comprometido a eficiência da reparação do DNA, favorecendo a apoptose por meio da ativação de BAX.

Em consonância com os achados do presente estudo, Srdic-Rajic *et al.* (2017) demonstraram que a combinação de *Viscum album* L. com doxorrubicina em células de câncer de mama humano ER+ MCF-7 resultou na inibição da parada do ciclo celular em G2/M e na regulação negativa de p21 e p53/p73. Além disso, foi observada a ativação das proteínas Erk1/2 e p38, indicando que a associação dos tratamentos favorece a apoptose e suprime a senescência. O estudo também verificou um aumento na expressão da proteína BAX, sugerindo a ativação da via apoptótica.

Essas hipóteses são sustentadas por estudos que demonstram o potencial da doxorrubicina em induzir danos ao DNA e modular proteínas pró-apoptóticas (Pilco-Ferreto; Calaf, 2016; Sharifi *et al.*, 2015). No contexto do presente estudo, a redução da expressão proteica de BCL-XL e o aumento de BAX reforçam a ideia de um efeito

sinérgico entre *Viscum album* L. e doxorubicina, intensificando a apoptose e dificultando a sobrevivência celular.

Os resultados aqui apresentados evidenciam os inúmeros desafios enfrentados na condução de experimentos com células de linhagem primária, sobretudo em condições com infraestrutura laboratorial limitada especialmente quando se trata de modelos pouco explorados, como o adenomioepitelioma canino.. A manipulação e manutenção dessas células requerem cuidados específicos, além de maior sensibilidade aos fatores ambientais e variações no cultivo, o que pode comprometer a reprodutibilidade e a padronização dos testes. Soma-se a isso a escassez de protocolos bem estabelecidos para modelos tumorais pouco descritos, como o adenomioepitelioma canino, o que impõe barreiras adicionais ao desenvolvimento de estudos mais aprofundados. Ainda assim, os dados obtidos contribuem de forma significativa para o avanço do conhecimento sobre a biologia tumoral em espécies não humanas, reforçando a importância de se investir em pesquisas básicas, mesmo diante de limitações estruturais. Este trabalho, portanto, representa um passo promissor na busca por alternativas terapêuticas e na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na progressão tumoral em modelos comparativos.

7. CONCLUSÕES

Com o desenvolvimento desse estudo pode-se concluir que:

- A morfologia celular da cultura primária de adenomioepitelioma maligno canino apresentou após exposição a *Viscum album* L., resposta citoprotetora, enquanto doxorrubicina isolada e associada apontou potencial efeito de indução de morte celular.
- Em células de adenomioepitelioma maligno canino, a exposição à *Viscum album* L. e doxorrubicina isoladas não alteram significativamente a expressão de proteínas que regulam a apoptose em 24/48h como BAX e BCL-XL, portanto, os tratamentos isolados buscam induzir a morte celular por outras vias até que ocorra a ativação da apoptose.
- A resposta terapêutica da associação de *Viscum album* L. e doxorrubicina é dependente de tempo-resposta.
- Doxorrubicina isolada possui capacidade de inibição da ativação de REF-1 em 48h devido ao aumento de danos no DNA.
- *Viscum album* L. e doxorrubicina demonstraram atuar sinergicamente, principalmente na potencialização de seus efeitos;
- A cultura primária de adenomioepitelioma maligno canino possibilitará o desenvolvimento de estudos moleculares e respostas terapêuticas para a utilização da associação dos compostos.

8. REFERÊNCIAS

ABDELMEGEED, S.; MOHAMMED, S. Canine mammary tumors as a model for human disease (Review). **Oncology Letters**, v.15, n. 6, p.1-10, 2018.

ABREU, I. A.; CABELLI, D. E. Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1804, n. 2, p. 263–274, 2010.

ANDO, K. *et al.* A new APE1/Ref-1-dependent pathway leading to reduction of NF- κ B and AP-1, and activation of their DNA-binding activity. **Nucleic acids research**, v. 36, n. 13, p. 4327–4336, 2008.

ANJALI BISHT *et al.* A comprehensive review on doxorubicin: mechanisms, toxicity, clinical trials, combination therapies and nanoformulations in breast cancer. **Drug delivery and translational research**, v.15, n.1, p. 102-133, 2024.

ANTONUCCI, S. *et al.* The Determining Role of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation and Monoamine Oxidase Activity in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 34, n. 7, p. 531–550, 2021.

ARCAMONE, F. *et al.* Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 11, n. 6, p. 1101–1110, 1969.

ARENDT, M. L. *et al.* PIK3CA is recurrently mutated in canine mammary tumors, similarly to in human mammary neoplasia. **Scientific Reports**, v. 13, n. 632, p. 1-8, 2023.

ARYAL, B.; RAO, V. A. Deficiency in Cardiolipin Reduces Doxorubicin-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Damage in Human B-Lymphocytes. **Plos One**, v. 11, n. 7, p. 1-20, 2016.

ATANASOV, A. G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, p. 200–216, 2021.

BANYS-PALUCHOWSKI, *et al.* Metronomic Chemotherapy for Metastatic Breast Cancer – a Systematic Review of the Literature. **Geburtshilfe und Frauenheilkunde**, v. 76, n. 05, p. 525–534, 2016.

BEDARD, K.; KRAUSE, K.H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 245–313, 2007.

BENAVENTE, M. A. *et al.* Canine mammary tumors: Risk factors, prognosis and treatments. **Journal of Animal and Veterinary Advances**. v. 6, n. 8, p. 1291–1300, 2016.

BEROUKHIM, R. *et al.* The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. **Nature**, v. 463, n. 7283, p. 899–905, 2010.

BERRA, C. M.; FREDERICO, C.; MASCIO, D. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340–1344, 2025.

BERTHEAU, P. *et al.* p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. **The Breast**, v. 22, p. 27–29, 2013.

BHATTI, J. S.; BHATTI, G. K.; REDDY, P. H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders — A step towards mitochondria based therapeutic strategies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 5, p. 1066–1077, 2017.

BIÈCHE, I. *et al.* HRAS is a therapeutic target in malignant chemo-resistant adenomyoepithelioma of the breast. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 14, n. 1, p. 1-5, 2021.

BIEGEL, U. *et al.* Viscum album L., a Therapeutic Option for Neoplastic Diseases in Companion Animals? A Systematic Review. **Complementary Medicine Research**, v. 29, n. 6, p. 465–482, 2022.

BRASILEIRO, F. C. Da. **COMPARAÇÃO DA RESPOSTA IN VITRO ENTRE OS TRATAMENTOS COM RESVERATROL, VISCUM ALBUM E/OU DOXORRUBICINA EM CULTURA DE CÉLULAS DE OSTEOSARCOMA CANINO**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Botucatu – SP 2022.

CACERES, S. *et al.* Establishment and characterization of a new cell line of canine inflammatory mammary cancer: IPC-366. **PloS One**, v. 10, n. 3, p. 1-17, 2015.

CARVALHO, B. C. **Neoplasia mamária em cadelas: caracterização histopatológica e expressão de proteínas de estresse (HSP 72)**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 2006.

CARVALHO, F. S. *et al.* Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: From Bioenergetic Failure and Cell Death to Cardiomyopathy. **Medicinal Research Reviews**, v. 34, n. 1, p. 106–135, 2013.

CARVALHO, M. I. *et al.* The Dog as a Model to Study the Tumor Microenvironment. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1329, p. 123–152, 2021.

CASSALI, G. D. *et al.* Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors-2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 7, n. 2, p. 38- 69, 2014.

CASSALI, G. *et al.* Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors - 2019. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 13, n. 3, p. 555–574, 2020.

CASSALI, G. *et al.* Consensus on the diagnosis, prognosis, and treatment of canine and feline mammary tumors: solid arrangement – 2023. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 17, n. 3, p. 152–163, 2024.

CHANG, L.C. *et al.* Exploring paraptosis as a therapeutic approach in cancer treatment. **Journal of Biomedical Science**, v. 31, n. 1, p. 1–23, 2024.

CHEN, Y. *et al.* Research progress on morphology and mechanism of programmed cell death. **Cell Death & Disease**, v. 15, n. 5, p. 1–13, 2024.

CHRISTIDI, E.; BRUNHAM, L. R. Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Cell Death & Disease**, v. 12, n. 4, p. 1–15, 2021.

CUI, W.; LENG, B.; WANG, G. Klotho protein inhibits H₂O₂-induced oxidative injury in endothelial cells via regulation of PI3K/AKT/Nrf2/HO-1 pathways. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 97, n. 5, p. 370–376, 2019.

CUI, Z. *et al.* PANoptosis: A new era for anti-cancer strategies. **Life Sciences**, v. 359, p. 123241, 2024.

DOLKA, I.; KRÓL, M.; SAPIERZYŃSKI, R. Evaluation of apoptosis-associated protein (Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 and p53) expression in canine mammary tumors: An immunohistochemical and prognostic study. **Research in Veterinary Science**, v. 105, p. 124–133, 2016.

ELLURU, S. R. *et al.* Antiangiogenic properties of viscum album extracts are associated with endothelial cytotoxicity. **Anticancer Research**, v. 29, n. 8, p. 2945–2950, 2009.

ESTEVEZ, F. S. C. *et al.* Aspectos epidemiológicos, clínicos e histopatológicos das neoplasias mamárias em cães do município Rio Branco, Acre, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 43, n. 6, p. 2547–2562, 2022.

FIGUEIREDO, R. **USO DE VISCUM ALBUM NO PONTO DE ACUPUNTURA VG14 COMO TERAPIA ADJUVANTE À MASTECTOMIA RADICAL EM CADELAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS**. Dissertação (Ciência Animal)- Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” faculdade de medicina veterinária câmpus de araçatuba, 2012.

FISHEL, S. *et al.* Multicentre study of the clinical relevance of screening IVF patients for carrier status of the annexin A5 M2 haplotype. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 29, n. 1, p. 80–87, 2014.

GE, A. *et al.* Mechanism of ferroptosis in breast cancer and research progress of natural compounds regulating ferroptosis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 28, n. 1, p. 1–26, 2023.

GHERMAN *et al.* Doxorubicin as a Potential Treatment Option in Canine Mammary Tumors. **Veterinary sciences**, v. 10, n. 11, p. 654–654, 2023.

GILLOOLY, J. F. *et al.* Explaining differences in the lifespan and replicative capacity of cells: a general model and comparative analysis of vertebrates. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1744, p. 3976–3980, 2012.

GOLDSCHMIDT, M. *et al.* Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 117-131, 2011.

GRAY, M. *et al.* Naturally-Occurring Canine Mammary Tumors as a Translational Model for Human Breast Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. 617, p. 1-17, 2020.

GREEN, D.R. **Cell Death. Apoptosis and Other Means to an End**. New York, 2018, 278p.

GREENWOOD, H. E.; WITNEY, T. H. Latest advances in imaging oxidative stress in cancer. **Journal of Nuclear Medicine**, v.62, n. 11, p. 1506-1510, 2021.

GURUDATH, S. *et al.* Estimation of Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase in Oral Submucous Fibrosis, Oral Leukoplakia and Oral Cancer - A Comparative Study. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 9, p. 4409–4412, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, ROBERT A. Hallmarks of cancer: the next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HONG, C.E.; PARK, A.K.; LYU, S.Y. Synergistic anticancer effects of lectin and doxorubicin in breast cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 394, n. 1-2, p. 225–235, 2014.

IZUMI, T. *et al.* Mammalian DNA base excision repair proteins: their interactions and role in repair of oxidative DNA damage. **Toxicology**, v. 193, n. 1-2, p. 43–65, 2003.

JABLONSKA, E. *et al.* Lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity relationship in breast cancer depends on functional polymorphism of GPX1. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2015.

JANISZEWSKA, M.; Primi, M. C.; Izard, T. Cell Adhesion in cancer: Beyond the Migration of Single Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 8, p. 2495–2505, 2020.

JARDIM, B. V. *et al.* Glutathione and glutathione peroxidase expression in breast cancer: an immunohistochemical and molecular study. **Oncology Reports**, v. 30, n. 3, p. 1119–1128, 2013.

JELIC, M. *et al.* Oxidative stress and its role in cancer. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 17, n. 1, p. 22-28, 2021.

JENSEN, C.; Teng, Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, n. 33, p. 33, 2020.

JIANG, Q. *et al.* Cuproptosis: a promising new target for breast cancer therapy. **Cancer Cell International**, v. 24, n. 1, p. 1-18, 2024.

JIAO, Y. *et al.* Glutathione peroxidases as oncotargets. **Oncotarget**, v. 8, n. 45, p. 80093–80102, 2017.

KALONI, D. *et al.* BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy. **Apoptosis**, v. 28, n. 1-2, p. 20–38, 2022.

KARTHIKEYAN SUBBURAYAN *et al.* Superoxide-mediated ferroptosis in human cancer cells induced by sodium selenite. **Translational Oncology**, v. 13, n. 11, p. 100843–100843, 2020.

KASZAK, I. *et al.* Current biomarkers of canine mammary tumors. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 60, n. 66, p. 1-13, 2018.

KATT, M. E. *et al.* In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 4, n. 12, 2016.

KAZUYA TSUBOUCHI *et al.* Involvement of GPx4-Regulated Lipid Peroxidation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis. **The journal of immunology** v. 203, n. 8, p. 2076–2087, 2019.

KCIUK, M. *et al.* Doxorubicin—An agent with multiple mechanisms of anticancer activity. **Cells**, v. 12, n. 4, p. 659–659, 2023.

KELLEY, M. R.; PARSONS, S. H. Redox Regulation of the DNA Repair Function of the Human AP Endonuclease Ape1/ref-1. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 3, n. 4, p. 671–683, 2001.

KIM, S., KIM, K. C., e LEE, C. Mistletoe (*Viscum album*) extract targets Axl to suppress cell proliferation and overcome cisplatin- and erlotinib-resistance in non-small cell lung cancer cells. **Phytomedicine**, v. 36, p. 183–193, 2017.

KIM, T.M. *et al.* Cross-species oncogenic signatures of breast cancer in canine mammary tumors. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 3616, 2020.

KLEINSIMON, S. *et al.* *Viscum*TT induces apoptosis and alters IAP expression in osteosarcoma in vitro and has synergistic action when combined with different chemotherapeutic drugs. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1-13, 2017.

KLINGEMANN, H. *Viscum album* (mistletoe) extract for dogs with cancer? **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, p. 1-4, 2024.

KLOPFLEISCH, R.; Gruber, A. D. Differential expression of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 1, p. 91–96, 2009.

KOLEINI, N.; KARDAMI, E. Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Oncotarget**, v. 8, n. 28, 2017.

KOVACS, E. The in vitro effect of *Viscum album* (VA) extract on DNA repair of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in cancer patients. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 2, p. 143–147, 2002.

KRISTIANSEN, V. *et al.* Effect of Ovariohysterectomy at the Time of Tumor Removal in Dogs with Mammary Carcinomas: A Randomized Controlled Trial. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 1, p. 230–241, 2016.

KROKAN, H. E.; Bjoras, M. Base Excision Repair. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 4, p. 1-22, 2013.

KUMARAGURUPARAN, R.; PRATHIBA, D.; NAGINI, S. Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 2, p. 218–224, 2006.

LEVI, M. *et al.* Doxorubicin treatment modulates chemoresistance and affects the cell cycle in two canine mammary tumour cell lines. **BMC Veterinary Research**, v. 17, n. 1, 2021.

LI, A. *et al.* Mitochondrial autophagy: molecular mechanisms and implications for cardiovascular disease. **Cell Death e Disease**, v. 13, n. 5, 2022.

LI, L. *et al.* ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 35, n. 5, p. 615–621, 2015.

LI, R. *et al.* A Novel Canine Mammary Cancer Cell Line: Preliminary Identification and Utilization for Drug Screening Studies. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p.1-12, 2021.

LIU, D. *et al.* Molecular Homology and Difference between Spontaneous Canine Mammary Cancer and Human Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 74, n. 18, p. 5045–5056, 2014.

LOPEZ, J.; TAIT, S. W. G. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. **British journal of cancer**, v. 112, n. 6, p. 957–62, 2015.

JUNIOR L. C. DE *et al.* Tratamento integrativo homeopático e farmacopuntura com *Viscum album* em carcinoma mamário canino: Relato de caso. **Pubvet**, v. 15, n. 6, p. 1–9, 2021.

MAVRIKOU, S. *et al.* Anticancer and biochemical effects of *Viscum album* L. protein extracts on HeLa cells. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 140, n. 2, p. 369–378, 2019.

MCDERMOTT, M. *et al.* In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies. **Frontiers in Oncology**, v. 4, n.40, p. 1-16, 2014.

MEDEIROS, V. B. Câncer da mama na cadela. **Journal of Surgical and Clinical Research**, v. 8, n. 1, p. 118-129, 2017.

MEREDITH, A.M.; DASS, C. R. Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 6, p. 729–741, 2016.

MICHAELS, M. L. *et al.* Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 15, p. 7022–7025, 1992.

MICHISHITA, M. Understanding of tumourigenesis in canine mammary tumours based on cancer stem cell research. **The Veterinary Journal**, v. 265, p. 105560, 2020.

MISHRA, R. *et al.* Viscum articulatum Burm. f. aqueous extract exerts antiproliferative effect and induces cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 219, p. 91–102, 2018.

MORANA, O.; WOOD, W.; GREGORY, C. D. The Apoptosis Paradox in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1328, 2022.

NAZARUK, J.; ORLIKOWSKI, P. Phytochemical profile and therapeutic potential of Viscum album L. **Natural Product Research**, v. 30, n. 4, p. 373–385, 2015.

NGO, V.; DUENNWALD, M. L. Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease. **Antioxidants**, v. 11, n. 12, p. 2345, 2022.

NICOLETTI, M. The Anti-Inflammatory Activity of Viscum album. **Plants (Basel)**, v. 12, n. 7, p. 1460–1460, 2023a.

NICOLETTI, M. The Antioxidant Activity of Mistletoes (Viscum album and Other Species). **Plants**, v. 12, n. 14, p. 2707–2707, 2023b.

NOCQUET, L. *et al.* Low BCL-xL expression in triple-negative breast cancer cells favors chemotherapy efficacy, and this effect is limited by cancer-associated fibroblasts. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2024.

NOSALOVA, N. *et al.* Canine Mammary Tumors: Classification, Biomarkers, Traditional and Personalized Therapies. **International journal of molecular sciences**, v. 25, n. 5, p. 2891–2891, 2024.

NUNGHATHAI SAWASDEE *et al.* Doxorubicin sensitizes breast cancer cells to natural killer cells in connection with increased Fas receptors. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 49, n. 3, p. 1-12, 2022.

OEI, S. L. *et al.* Impact of Oncological Therapy and Viscum album L Treatment on Cancer-Related Fatigue and Internal Coherence in Nonmetastasized Breast Cancer Patients. **Integrative Cancer Therapies**, v. 19, p. 1-16, 2020.

ÖNAY-UÇAR *et al.* Viscum album L. Extracts Protects HeLa Cells against Nuclear and Mitochondrial DNA Damage. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1–7, 2012.

PARK, Y. R. *et al.* Viscum album Induces Apoptosis by Regulating STAT3 Signaling Pathway in Breast Cancer Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 15, p. 11988–11988, 2023.

PARUL TANWAR *et al.* Adenomyoepithelioma of breast in an adolescent patient. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 893–893, 2023.

PASCOLI A.L., *et al.* Campanha de orientação, prevenção e diagnóstico precoce de tumores mamários em cadelas e prevalência desses tumores diagnosticados durante a campanha realizada no município de Blumenau-SC. **Archives of Veterinary Science**, v. 22, n. 2, p.1-23, 2017.

PERILLO, B. *et al.* ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 52, n. 2, p. 192–203, 2020.

PIETRZAK, W.; NOWAK, R. Impact of Harvest Conditions and Host Tree Species on Chemical Composition and Antioxidant Activity of Extracts from Viscum album L. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3741, 2021.

PILCO-FERRETO, N.; CALAF, G. M. Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. **International Journal of Oncology**, v. 49, n. 2, p. 753–762, 2016.

PILLAI, V. B. *et al.* Sirt3 protects mitochondrial DNA damage and blocks the development of doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 310, n. 8, p. 962–972, 2016.

POONTHANANIWATKUL, B. *et al.* Cancer patients taking herbal medicines: A review of clinical purposes, associated factors, and perceptions of benefit or harm. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 58–66, 2015.

QIAO, X. *et al.* Uncoupling DNA damage from chromatin damage to detoxify doxorubicin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 26, p. 15182–15192, 2020.

QUEIROGA, F. L. *et al.* Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17 β -estradiol) in canine mammary tumours. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 110, n. 1-2, p. 76–82, 2008.

RADWAN, E. M. *et al.* Effect of recombinant human erythropoietin and doxorubicin combination on the proliferation of MCF-7 and MDA-MB231 breast cancer cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 5, p. 3945–3952, 2016.

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, p. 2977–2992, 2016.

RICHTER *et al.* From donor to the lab: a fascinating journey of primary cell lines. **Frontiers in cell and developmental biology**, V. 22, N. 9, p.1–11, 2021.

RIVANKAR, S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 10, n. 4, p. 853–8, 2014.

RUEDA, J. *et al.* Mammary neoplasms in female dogs: Clinical, diagnostic and therapeutic aspects. **Veterinární medicína**, v. 69, n. 4, p. 99–114, 2024.

DE SUMMA, S. *et al.* Expression of base excision repair key factors and miR17 in familial and sporadic breast cancer. **Cell death and disease**, v. 5, n. 2, p. e1076–e1076, 2014.

SALINAS-JAZMÍN, N. *et al.* Continuous exposure to doxorubicin induces stem cell-like characteristics and plasticity in MDA-MB-231 breast cancer cells identified with the SORE6 reporter. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 94, n. 4, p. 571–583, 2024.

SANTOS, T. R. *et al.* Risk factors associated with mammary tumors in female dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, n. 6, p. 466–473, 2020.

SARDÃO, V. A. *et al.* Morphological alterations induced by doxorubicin on H9c2 myoblasts: nuclear, mitochondrial, and cytoskeletal targets. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, n. 3, p. 227–243, 2009.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, NAVDEEP S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. 453–462, 2014.

SEKEROĞLU, V.; AYDIN, B.; SEKEROĞLU, Z. A. Viscum album L. extract and quercetin reduce cyclophosphamide-induced cardiotoxicity, urotoxicity and genotoxicity in mice. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 12, n. 11, p. 2925–31, 2011.

SEVASTRE, B. *et al.* Viscum album L. Alcoholic Extract Enhance the Effect of Doxorubicin in Ehrlich Carcinoma Tumor Cells. **Romanian biotechnological letters**, v. 17, n. 1, 2012.

SHARIFI, S. *et al.* Doxorubicin Changes Bax /Bcl-xL Ratio, Caspase-8 and 9 in Breast Cancer Cells. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 5, n. 3, p. 351–359, 2015.

SILVA, B. R. *et al.* **ADENOMIOEPITELIOMA MALIGNO EM PAPILA MAMÁRIA DE CADELA** – Relato De Caso. *Even3*, v. 3, p. 1, 2021.

SINGH, R.; LETAI, A.; SAROSIEK, K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 3, p. 175–193, 2019.

SIQUEIRA, P. B. *et al.* The inhibitor of the redox activity of APE1/REF-1, APX2009, reduces the malignant phenotype of breast cancer cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 57, p.1-9, 2024.

SPOERRI, M. *et al.* Endocrine control of canine mammary neoplasms: serum reproductive hormone levels and tissue expression of steroid hormone, prolactin and growth hormone receptors. **BMC veterinary research**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2015.

SRDIC-RAJIC, T. *et al.* Iscador Qu inhibits doxorubicin-induced senescence of MCF7 cells. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 3763, 2017.

SRDIC-RAJIC, T. *et al.* Sensitization of K562 Leukemia Cells to Doxorubicin by the *Viscum album* Extract. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 3, p. 485–495, 2015.

STAN, R. *et al.* Comparative study concerning mistletoe viscotoxins antitumor activity. **Acta Biologica Hungarica**, v. 64, n. 3, p. 279–288, 2013.

STRASSER, A. *et al.* Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. **The EMBO Journal**, v. 14, n. 24, p. 6136–6147, 1995.

SZURPNICKA, A.; KOWALCZUK, A.; SZTERK, A. Biological activity of mistletoe: in vitro and in vivo studies and mechanisms of action. **Archives of Pharmacal Research**, v. 43, n. 6, p. 593–629, 2020.

TADOKORO, T. *et al.* Mitochondria-dependent ferroptosis plays a pivotal role in doxorubicin cardiotoxicity. **JCI Insight**, v. 5, n. 9, p. 1-20, 2020.

TANG, C. *In vitro* vs. In vivo: Is One Better? 2019. Disponível em: <<https://www.uhnresearch.ca/news/vitro-vs-vivo-one-better>>. Acesso em: 25 de dezembro 2025.

TEDARDI M. V. *et al.* Epidemiologia e etiologia do câncer. Daleck, CR; Nardi, ABD **Oncologia em cães e gatos**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Roca, p. 1-28, 2016.

TORRES, C. G. *et al.* Hormonal Carcinogenesis in Canine Mammary Cancer: Molecular Mechanisms of Estradiol Involved in Malignant Progression. **Animals**, v. 11, n. 3, p. 608, 2021.

TSUBOUCHI, K. *et al.* Involvement of GPx4-Regulated Lipid Peroxidation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis. **The journal of immunology**, v. 203, n. 8, p. 2076–2087, 2019.

UÇAR, E. Ö.; ARDA, N.; AITKEN, A. Extract from mistletoe, *Viscum album* L., reduces Hsp27 and 14-3-3 protein expression and induces apoptosis in C6 rat glioma cells. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 3, p. 2801–2813, 2012.

UYSAI *et al.* Cell and tissue culture: the base of biotechnology. *In: Omics technologies and bio-engineering: towards improving quality of life*. Elsevier, v. 1. p. 391–429, 2018.

VALLE *et al.* Homoeopathic *Viscum album* (10-3) is More Cytotoxic to in vitro Culture of Human Breast Cancer Cell Line than to Human Mesenchymal Stem Cells. **International Journal of High Dilution Research**, v.19, n. 4, p. 25–34, 2020.

VALLE, A. C. V.; CARVALHO, A. C. De. Integrative oncology using the viscum album therapy improves quality of life in a dog diagnosed with oral fibrosarcoma - case report / Oncologia integrativa por meio da terapia viscum album melhora a qualidade de vida em um cão diagnosticado com fibrossarcoma oral - relato de caso. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 3, p. 17732–17754, 2022.

VALLE, A. C. V.; VALLE, M. L. P. V.; CARVALHO, A. C. De. Injectable *Viscum album* therapy in the treatment and survival of patients diagnosed with hepatoid carcinoma. **Pubvet**, v. 18, n. 03, p. 1-6, 2024.

VALLE, A. C. V.; VALLE, M. L. V. Fibrosarcoma in a young dog treated with injectable *Viscum album* therapy. **Pubvet**, v. 19, n. 03, p. 1-6, 2025.

VAN DER ZANDEN, S. Y.; QIAO, X.; NEEFJES, J. New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. **The Febs Journal**, v. 288, n. 21, p. 6095–6111, 2020.

VASCELLARI, M. *et al.* Incidence of mammary tumors in the canine population living in the Veneto region (Northeastern Italy): Risk factors and similarities to human breast cancer. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 126, p. 183-189, 2016.

VAZ, L. D. *et al.* Resveratrol and *Viscum album* anticancer effect in canine mammary tumor cell lines. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 17, n. 2, p. 93–98, 2024.

VAZQUEZ, E. *et al.* Canine Mammary Cancer: State of the Art and Future Perspectives. **Animals**, v. 13, n. 19, p. 3147, 2023.

VERMA A, VERMA M, SINGH A. Animal tissue culture principles and applications. **Animal Biotechnology**. v. 26, p. 269–293, 2020.

VITALE, R.; MARZOCCO, S.; POPOLO, A. Role of Oxidative Stress and Inflammation in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: A Brief Account. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 13, p. 7477–7477, 2024.

VOSS, A. K.; STRASSER, A. The essentials of developmental apoptosis. **F1000Research**, v. 9, p. 1-12, 2020.

WANG, J. *et al.* Reassessing the roles of oxidative DNA base lesion 8-oxoGua and repair enzyme OGG1 in tumorigenesis. **Journal of Biomedical Science**, v. 32, n. 1, p. 1-13, 2025.

WANG, R. *et al.* OGG1-initiated base excision repair exacerbates oxidative stress-induced parthanatos. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 6, p. 1–15, 2018.

WRIGHT, A.; WATANABE, R.; KOEHLER, J. W. European Mistletoe (*Viscum album*) Extract Is Cytotoxic to Canine High-Grade Astrocytoma Cells In Vitro and Has Additive Effects with Mebendazole. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 1, p. 31, 2022.

XU, E. *et al.* Establishment and transcriptome characterization of tamoxifen-resistant canine mammary gland tumor cells. **Research in Veterinary Science**, v. 145, p. 135–146, 2022.

YADANG, F. *et al.* In vitro anti-oxidative and anti-inflammatory properties of *Viscum album*. **Academia Journal of Medicinal Plants**. v. 10, n. 5, p. 061–071, 2022.

YILDIRIM, F. *et al.* Köpek Meme Tümörlerinde Bcl-2, Bcl-XL ve Bax Sunulumu İle Apoptotik İndeksin Değerlendirilmesi. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 20, n. 4, p. 513-520, 2014.

YUZEFOVYCH, L. V. *et al.* Mitochondria-Targeted DNA Repair Glycosylase hOGG1 Protects Against HFD-Induced Liver Oxidative Mitochondrial DNA Damage and Insulin Resistance in OGG1-Deficient Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 22, p. 12168–12168, 2024.

ZAMBRANO-ESTRADA, X. *et al.* Molecular iodine/doxorubicin neoadjuvant treatment impair invasive capacity and attenuate side effect in canine mammary cancer. **BMC Veterinary Research**, n. 14, n. 1, p. 1-14, 2018.

ZHAI, D.Y. *et al.* Malignant adenomyoepithelioma of the breast: Two case reports and review of the literature. **World journal of clinical cases**, v. 9, n. 31, p. 9549–9556, 2021.

ZHANG, Q. *et al.* Activation of Nrf2/HO-1 signaling: An important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress. **Journal of Advanced Research**, v. 34, n. 6, p. 43–63, 2021.

ZHANG, S. *et al.* Doxorubicin downregulates autophagy to promote apoptosis-induced dilated cardiomyopathy via regulating the AMPK/mTOR pathway. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 162, p. 114691, 2023.